

GDF15, un nuevo biomarcador en la enfermedad renal

TESIS DOCTORAL

María Vanessa Pérez Gómez

IIS HOSPITAL UNIVERSITARIO FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ | MAYO 2017

DIRECTORES:

ALBERTO ORTIZ Y MARIA DOLORES SANHEZ NIÑO

Agradecimientos

Para empezar, quiero agradecer al **Dr. Alberto Ortiz**, mi mentor y director de tesis. Desde el día que te conocí has creído en mí, me has ayudado y guiado en mi formación como nefróloga e investigadora. Es difícil para mí expresar con palabras lo que representas en mi vida. Te admiro, con cada trabajo que hemos hecho juntos me has transmitido amor por lo que haces y dedicación... y algo que siempre te he dicho: a pesar de tener motivos, nunca te has mostrado estresado o cansado, y por el contrario, siempre estás con una sonrisa y dispuesto a escuchar y ayudar. Trabajar contigo es un honor, soy afortunada de tenerte en mi vida como mentor y amigo.

En segundo lugar, a mi querida directora de tesis, **María Dolores Sánchez Niño "Loli"**. Juntas nos hemos embarcado en muchos proyectos... esta tesis uno de ellos. Debo confesarte que muchas veces pensé: "que lista, organizada y trabajadora es Loli". No conforme con eso, eres súper divertida, tu sentido del humor ha sido motivo de carcajadas que han hecho nuestras horas de trabajo mucho más amenas. Cómo olvidar las tardes de grabación de los videos del MOOC... Loli, gracias por tu guía y apoyo.

Para continuar, no sería la profesional que soy si no me hubiese formado en el "**Servicio de Nefrología del Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz**". Os agradezco que hayáis tallado poco a poco mi perfil profesional, y que lo continuéis haciendo día a día en cada sesión, cada pase de guardia, en cada "me parece bien lo que has hecho" o "yo habría hecho esto". Somos un gran equipo, médicos, enfermeros y auxiliares, cada uno con sus particularidades, como una familia, hemos aprendido a aceptarnos, adaptarnos y querernos los unos a los otros, de tal manera que reforzamos nuestras virtudes y nos hacemos más grandes. Dentro del servicio quiero dedicar unas pequeñas palabras a personas que han marcado de forma especial mi vida:

- Quiero empezar por el súper jefe que tenemos, el **Dr Jesús Egido**. Me llena de orgullo decir que eres mi jefe, tu trayectoria profesional es impresionante. Admiro tu capacidad de resolver casos clínicos, tu seguridad para saber lo que hay que hacer por muy difícil que parezca el diagnóstico o dudoso el tratamiento... admiro también tu capacidad de oratoria, eres capaz de contar algo muy serio, y a la vez endulzado con chistes o comentarios graciosos, que hacen que oírte hablar sea agradable para cualquier público.
- **Emilio González Parra**. No sé si alguna vez te he agradecido el apoyo, impulso y calor humano que me diste durante la residencia. Tu creíste en mí, me diste refuerzo positivo en los momentos que más lo necesité, me ayudaste, te preocupaste por mi formación y mi bienestar. Por eso te estaré eternamente agradecida. Cuenta conmigo para lo que necesites.
- **Jesús Hernández, Raquel Alegre, Gabriela Rosello, Jorge Rojas y Ana Ramos**. Sois los expertos, los referentes que he tenido durante mi formación, os agradezco los conocimientos que habéis compartido conmigo, son tantas las historias que hemos vivido, tantas las veces que me habéis ofrecido desinteresadamente vuestra ayuda y aportado vuestra experiencia, que sería difícil contar aquí, pero vosotros formáis parte de lo que soy, y por ende, de esta tesis.
- **Carolina Gracia, Catalina Martín, Beatriz Fernández y Laura Rodríguez Osorio**. Vosotras os habéis convertido en ese compañero de trabajo cercano, a quien muchas veces es más fácil pedir ayuda o apoyo... un cambio de guardia, cubrir alguna actividad, una duda rápida sobre un paciente... estáis en todo, en mi día a día, no solo en el trabajo, sino también en mi vida personal, os preocupáis por mi vida, por mi familia... en fin, vosotras sois mis amigas.
- **Didier Sánchez**. El mejor amigo que he hecho en España. Tu presencia en mi formación ha sido una pieza clave, somos igual de curiosos... ¿cuántas dudas hemos desentrañado juntos?, nos encanta entenderlo todo, saber el por qué de todo... No

habría sido lo mismo estar en diálisis sin ti, no habría querido tanto a la diálisis sin un profesor como tú. Siempre te dije, eres el mejor enfermero del mundo, y ahora que estás estudiando medicina, sé que serás el mejor médico (espero que nefrólogo) del mundo, y ahí me tendrás siempre a tu lado.

- Otros integrantes del servicio... gracias por estar ahí, por vuestras ganas de trabajar, de aprender, de hacer las cosas bien y siempre con ese buen ánimo y energía que caracteriza al servicio... quiero resaltar especialmente a quienes han sufrido estos meses de tesis y me han dado un soporte incalculable: **Jinny y Sole** (gracias por la ayuda con la base de datos en el último momento), **Raquel, Raul, Esmeralda, Bea, Javi, Filipo, Marta, Sandra, Paloma, Susana, Paula, Laura y Eva** (gracias por el apoyo... ¡y a algunos por servir de controles!).
- **Enfermeros de la planta y personal de laboratorio:** sin vuestra ayuda las muestras de los pacientes no habrían podido ser estudiadas, vosotros habéis hecho una parte muy importante de este trabajo.

Quiero ahora agradecer a una persona que desde hace algunos años ha pasado a ocupar un puesto muy importante en mi vida, al **Dr. Jerónimo Farré**. Como jefe de residentes he trabajado mano a mano contigo, en un mismo despacho, cara a cara... y eso me ha dado herramientas muy importantes para mi profesión. Eres un gestor excelente, un jefe organizado, resolutivo y honesto. No siempre podemos ver a una persona brillante tan de cerca, ver como se desenvuelve en su vida y aprender de eso. Tú me has dado valores, formación, has tallado mi personalidad, mi carácter, soy alguien nuevo desde que te conozco y eso es algo que te quiero agradecer. Además, me has dado herramientas importantes para la vida personal, tú y **Rosa** me habéis hecho parte de vuestra familia, me habéis mostrado lo divertido que es el fútbol, la música clásica, la pintura, los vinos... Desde mi corazón os digo, vosotros sois parte de mi familia, y me siento muy afortunada por eso.

A Lucia Rodríguez, mi amiga, compañera en la jefatura de residencia y mi psicóloga personal... qué gusto trabajar contigo, eres trabajadora, eficiente, colaboradora, súper lista... qué gusto que seamos amigas, contarte mis cosas, ir de fiesta juntas... también has sido un apoyo en la realización de esta tesis, gracias por eso amiga.

A mi familia, el soporte que, de forma increíble, desde la distancia me sostienen, me ayudan, se preocupan por mí, me quieren sobre todas las cosas, me dan calor de familia. A mi Papá, **Jorge Pérez**, mi referente, mi ídolo, mi mejor consejero en la distancia... todo lo que quería de niña era "ser como tú", y lo sigo queriendo... a mi mamá, **María Auxiliadora Gómez**, la mujer más hermosa y cariñosa que existe, cuanto amor puede caber en una persona, en esta tesis van también tus enseñanzas a hacer "introducción y conclusiones" que me enseñabas con los trabajos del colegio... A **María Patricia Pérez**, mi hermana, digamos que súper hermana, mi compañera de vida, tú has sido la principal espectadora de mis éxitos y fracasos, quien más me conoce en el mundo, me has ayudado, animado, impulsado... gracias porque no habría podido hacer esta tesis, ni nada de lo que soy, sin tu ayuda. A **María del Carmen Pérez**, mi hermana menor, la consentida de la casa, la razón original por la que quise ser nefróloga, verte bien es mi felicidad, la vida nos premió con tu presencia, tus cariños, tu trato amable y tu sonrisa continua, eres la princesita que nos hace mejor nuestros días.

A **Pablo**, mi cuñado y amigo, tú te has ganado mi corazón, gracias por tu apoyo en todo lo que has podido. Mis amigos de vida que han estado y seguirán estando, apoyándome en todos mis proyectos: **Mary Esther, Antha, Anna, Javi y Mariale**.

Finalmente quiero agradecer a **Dios**. Te siento conmigo desde que era una niña, estas en todos mis pasos, todas mis decisiones, sé que pones en mi camino a personas maravillosas que me han ayudado a cumplir mis metas, y sé que me has dado las herramientas para afrontar los obstáculos de la vida. Te agradezco por todo lo que me das y por esta nueva meta alcanzada.

Abreviaturas

Abreviatura	Significado
AMBG	Anticuerpo anti membrana basal glomerular
ANCA	Anticuerpo anti citoplasma de neutrófilo
Anti-DNA	Anticuerpos anti DNA
ANA	Anticuerpos anti nucleares
anti-PLA2R	Anticuerpo anti receptor de fosfolipasa A2
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ASLO	Anti estreptolisina O
AUC	Área bajo la curva (area under curve)
Cr	Creatinina
DM	Diabetes mellitus
eem	error estándar de la media
ERC	Enfermedad renal crónica
FDR	Fold discovery rate (valor ajustado de p)
FGe	filtrado glomerular estimado
FRA	Fracaso renal agudo
GDF15	Growth/differentiation factor-15
GN	Glomerulonefritis
GNMP	Glomerulonefritis membranoproliferativa
GSFS	Glomerulosclerosis focal y segmentaria
Hb	Hemoglobina
HTA	Hipertensión arterial
IgA	Inmunoglobulina A
m	Media
MAU/Cr	Cociente microalbuminuria/creatinina
ND	Nefropatía diabética
NIgA	Nefropatía IgA
NL clase II, III, IV o V	Nefritis lúpica clase II, III, IV o V (clasificación OMS)
ns	No significativo
RT-PCR	Transcripción inversa y PCR a tiempo real
TGF-β	Factor de crecimiento transformante humano β
UA	Unidades arbitrarias

Tabla de Contenido

Resumen.....	10
Introducción.....	12
1. Enfermedad renal crónica.....	13
2. Nefropatías glomerulares, comúnmente englobadas bajo el término: glomerulonefritis.....	14
2.1. Tratamiento de las glomerulonefritis	18
2.2. Patogenia de las glomerulonefritis	21
3. Biomarcadores para el estudio de la ERC.....	28
3.1. ¿Por qué necesitamos biomarcadores en la ERC?	30
4. Súper Familia TGF-β.....	31
4.1. Súper familia TGF- β en la ERC.....	34
5. GDF15.....	35
5.1. GDF15 como biomarcador renal.....	39
Hipótesis y Objetivos.....	42
Hipótesis	43
Objetivos	44
Objetivo General.....	44
Objetivos Específicos	44
Materiales y Métodos	45
1. Primera parte: experimental	48
1.1. Modelos experimentales	48
1.1.1. Modelo de fracaso renal agudo	48
1.1.2. Modelo de daño renal por proteinuria	49
1.1.3. Modelo de respuesta renal a la inflamación sistémica.....	50
1.1.4. Modelo de nefritis lúpica	51
1.2. Procesamiento de los tejidos.....	52
1.3. Extracción de ARN	53
1.4. Transcriptómica por técnica de arrays	54
1.5. Transcriptómica por técnica de RNA-seq	54
1.6. Transcripción inversa y PCR a tiempo real.....	54
1.7. Análisis estadístico de datos experimentales	55
2. Segunda parte: data mining.....	56
2.1. Acceso y búsqueda de datos en Nephroseq.....	56
2.2. Análisis estadístico de data mining.....	58

3. Tercera parte: cohorte de pacientes con biopsia renal.....	58
3.1. Aspectos éticos	58
3.2. Selección de pacientes	58
3.3. Recolección y procesamiento de muestras	59
3.3.1. Muestras de sangre y orina	59
3.3.2. Muestras de biopsia renal	59
3.4. Recolección de datos clínicos y analíticos de los pacientes.....	60
3.5. Controles	64
3.6. ELISA	64
3.7. Inmunohistoquímica.....	64
3.8. Análisis estadístico de los datos de pacientes	65
Resultados.....	68
1. Primera parte: experimental	69
1.1. Modelo de fracaso renal agudo.....	69
1.2. Modelo de daño renal por proteinuria.....	70
1.3. Modelo de respuesta renal a la inflamación sistémica.....	71
1.4. Modelo de nefritis lúpica.....	73
2. Segunda parte: data mining.....	76
2.1. Estudios experimentales.....	76
2.2. Estudios en humanos.....	78
2.2.1. Expresión de GDF15 en un tejido renal normal	79
2.2.2. Expresión de GDF15 en Enfermedad Renal Crónica	79
2.2.3. Expresión de GDF15 en glomérulos en pacientes con glomerulonefritis	81
2.2.4. Expresión de GDF15 en Tubulointersticio en Riñones con glomerulonefritis	83
3. Tercera parte: clínica.....	85
3.1. Descripción de la población.....	85
3.2. Análisis transversal de valores de GDF15	88
3.2.1. GDF15 en pacientes en comparación con controles	89
3.2.2. Correlación de niveles de GDF15 en suero con niveles de GDF15 en orina	89
3.2.3. GDF15 por sexo.....	90
3.2.4. GDF15 por categorías de ERC: Filtrado glomerular	90
3.2.5. GDF15 por categoría de ERC: Albuminuria	92
3.2.6. GDF15 en función de hematuria.....	92
3.2.7. GDF15 en función del FG y la Albuminuria	93
3.2.8. Relación GDF15 con variables basales clínicas y analíticas.....	94

3.2.9.	Correlaciones univariantes de GDF15	97
3.2.10.	GDF15 por causa de ERC.....	100
3.2.11.	Modelos multivariantes para predicción de valores de GDF15 en suero y orina.....	103
3.3.	Evolución de pacientes	109
3.3.1.	Relación de GDF15 con la evolución	109
3.3.2.	GDF15 como predictor de la evolución: estudios multivariantes.....	111
3.4.	Expresión de GDF15 en biopsias renales	118
Discusión	120
1.	Expresión renal de GDF15 en nefropatías experimentales y humanas	121
2.	En pacientes con nefropatías biopsiados están aumentadas las concentraciones urinarias y séricas de GDF15.....	124
3.	Los valores de GDF15 urinario podrían contribuir a diferenciar la causa del daño renal en pacientes diabéticos.....	125
4.	Los niveles séricos y urinarios de GDF15 identifican pacientes con un alto riesgo de muerte.....	126
5.	¿De dónde proviene el GDF5 urinario?.....	128
6.	¿Por qué un GDF15 urinario alto se asocia a mortalidad?.....	129
7.	Diferencias entre hombres y mujeres.....	130
8.	Fortalezas.....	131
9.	Debilidades	132
10.	Resumen	133
Conclusiones	134
Referencias Bibliográficas	136

Resumen

La enfermedad renal crónica (ERC) es la causa de muerte no transmisible que más aumentó su incidencia en el periodo 1990 al 2013. Las glomerulonefritis son la tercera causa más frecuente de ERC. Es necesario realizar un diagnóstico específico para establecer un tratamiento. La biopsia renal es el método más valioso para el estudio de glomerulonefritis, sin embargo, tiene muchas limitaciones (invasiva, requiere tiempo, recursos y personal médico entrenado). Por otro lado, similares cambios morfológicos pueden requerir abordajes diferentes, lo que hace que existan grandes esperanzas en los biomarcadores. Los biomarcadores evalúan objetivamente procesos biológicos normales, patogénicos o respuesta a tratamientos, podrían complementar la información de la biopsia renal e incluso podrían evitar su realización. Además, podrían detectar la ERC antes de que exista disminución del filtrado glomerular <60 ml/min/1.73 m² o albuminuria >30 mg/g (criterios actuales para el diagnóstico de ERC). En un estudio transcriptómico de un modelo preclínico objetivamos que el gen de la familia de GDF más sobre expresado fue el Growth/differentiation factor-15 (GDF15). Hipotetizamos que GDF15 podría ser un marcador de enfermedad renal en nefropatías experimentales y clínicas. En bases de datos transcriptómicas renales, objetivamos un aumento de la expresión renal de GDF15 en numerosa glomerulopatías intersticiales y glomerulares experimentales y humanas, esto sugiere que GDF15 puede ser una respuesta relativamente inespecífica al estrés de las células renales. El estrés celular suele generar una respuesta inflamatoria. Por lo que evaluamos el efecto de la administración sistémica de una citoquina inflamatoria sobre la expresión renal de GDF15. Sin embargo, la administración sistémica de Tweak bajó los niveles de GDF15 con lo cual la inflamación podría no ser responsable del aumento de expresión local de GDF15 del daño renal. Sin poder descartar que sean otros mediadores de la inflamación los responsables del aumento del GDF15, hipotetizamos que otros factores, quizá factores nefroprotectores podrían ser los responsables. Los niveles urinarios y séricos de GDF15 estaban aumentados en pacientes con ERC biopsiada. Los aspectos más prometedores del estudio fueron las asociaciones entre niveles de GDF15 urinario con mortalidad y con el diagnóstico de nefropatía diabética en pacientes con diabetes. Ambos hallazgos requieren validación en una segunda cohorte. Ya hemos comenzado estos estudios de validación.

Introducción

1. Enfermedad renal crónica

La Enfermedad Renal Crónica (ERC) es una entidad definida por la disminución de la función renal, determinada por una tasa de filtración glomerular estimado (FGe) menor a 60 ml/min/1.73 m², o por la existencia de daño renal, determinado por una eliminación urinaria de albúmina superior a 30 mg/día o mg/g de creatinina; de al menos 3 meses de evolución, independientemente de la causa (1). Es un problema importante de salud pública que ha presentado un rápido crecimiento en los últimos años. Es la causa de muerte no transmisible que más aumentó su incidencia en el periodo de 1990 al 2013, pasando de la posición 14 a la 8 del ranking mundial, con una tasa de más de 13 muertes por 100.000 habitantes (2). En España según datos del 2001 existe una prevalencia de un 10% en la población mayor de 20 años, alcanzando más de un 20% en mayores de 60 años, y probablemente está infra diagnosticada (3).

La ERC se produce principalmente como consecuencia de otras enfermedades sistémicas como la hipertensión arterial (HTA) o la diabetes mellitus (DM), principales causas en países desarrollados con mayor expectativa de vida, pero también se produce como consecuencia de enfermedades primarias del riñón, como las glomerulonefritis, principal causa de ERC terminal en pacientes jóvenes (4, 5). En la Figura 1 está representada la distribución de las causas de ERC en pacientes de todas las edades, que iniciaron terapia renal sustitutiva en España en el año 2013 (6).

En el tratamiento de la ERC se ha determinado un protocolo de actuación común a todas las causas, que va dirigido a evitar o enlentecer la progresión de la enfermedad y tratar las complicaciones (anemia, alteraciones del metabolismo mineral, alteraciones iónicas, acidosis metabólica, sobrecarga de volumen, dislipemia, hipertensión, uremia, infecciones) (1). Sin embargo, en ocasiones es necesario identificar la causa de la ERC para poder instaurar un tratamiento específico.

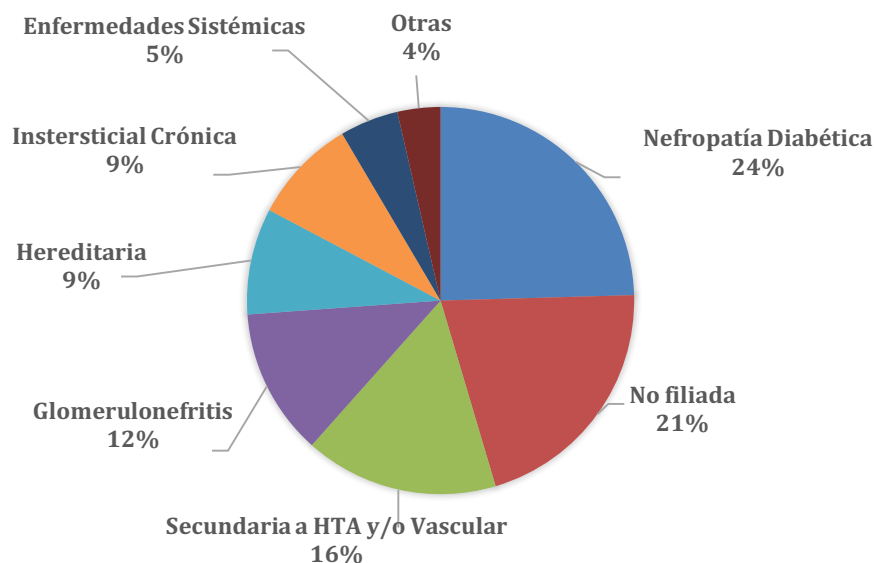


Figura 1 Etiología de la Enfermedad Renal Crónica en pacientes que iniciaron terapia renal sustitutiva en España, año 2013 (6) (HTA: hipertensión arterial)

Para diagnosticar la etiología de la ERC, actualmente la biopsia renal es el método más fiable en un elevado número de nefropatías. La sospecha de una nefropatía glomerular es una indicación frecuente de biopsia renal, ya que su diagnóstico puede requerir un tratamiento específico.

*2. Nefropatías glomerulares, comúnmente englobadas bajo el término: **glomerulonefritis***

Son un conjunto de enfermedades muy heterogéneo, con frecuencia con una base inmunológica y afectan principalmente al glomérulo renal, aunque posteriormente se pueden implicar otras partes de la nefrona. Comúnmente a las nefropatías glomerulares se les denomina genéricamente glomerulonefritis, aunque algunos autores prefieren reservar el término glomerulonefritis para las formas más inflamatorias. En este trabajo cuando hablamos de glomerulonefritis nos referimos a las nefropatías glomerulares en general.

Las glomerulonefritis se pueden clasificar en primarias y secundarias. Se denominan glomerulonefritis primarias cuando las manifestaciones clínicas están restringidas al riñón y glomerulonefritis secundarias cuando son consecuencia de enfermedades sistémicas que ocasionan afectación glomerular (7, 8). Las glomerulonefritis primarias representan el tercer grupo más frecuente de causas de ERC en países desarrollados, después de la nefropatía diabética y nefropatía secundaria a HTA (figura 1).

El diagnóstico de glomerulonefritis se sospecha por datos clínicos, analíticos y de historia familiar. La presentación clínica puede abarcar un amplio rango de manifestaciones: (4, 7).

- Hipertensión Aislada
- Alteraciones urinarias asintomáticas (AUA): hematuria microscópica y/o proteinuria (generalmente <1 g/día)
- Hematuria macroscópica sin coágulos
- Síndrome nefrótico: edema, hipoalbuminemia, hipercolesterolemia y proteinuria >3,5 g/día
- Síndrome nefrítico: oliguria, hematuria, proteinuria <3,5 g/día, edema e HTA
- Glomerulonefritis rápidamente progresiva (deterioro de la función renal en días o semanas que puede llegar a anuria, asociado a proteinuria y hematuria).

Las glomerulonefritis primarias pueden clasificarse en 7 categorías. A pesar de que no existe ningún signo clínico específico, la asociación de ciertos parámetros clínicos y analíticos pueden sugerir una de las categorías (tabla 1). Sin embargo, con la única excepción de síndrome nefrótico en niños que responde a tratamiento con esteroides (que sugiere nefropatía de cambios mínimos), en el resto es necesaria la realización de una biopsia renal para confirmar el diagnóstico e instaurar un tratamiento específico (4, 7, 9).

Tabla 1 Clasificación de las glomerulonefritis primarias y datos de presentación clínicos y analíticos que sugieren el diagnóstico

GN Primaria	Datos clínicos	Datos analíticos
Nefropatía de cambios mínimos	niño o adulto joven con síndrome nefrótico	
Nefropatía IgA (NIgA)	adulto joven con AUA, brotes de hematuria macroscópica (principalmente 1-2 días después de infección respiratoria), menos frecuente síndrome nefrótico	puede asociarse a IgA sérica elevada
Nefropatía membranosa	adulto mayor con síndrome nefrótico, menos frecuentes AUA	anti-PLA2R
Glomeruloesclerosis focal y segmentaria (GSFS)	síndrome nefrótico, menos frecuentes AUA	
Glomerulonefritis membranoproliferativa (GNMP)	síndrome nefrótico - nefrítico, menos frecuentes AUA	disminución de C3 y C4 (consumo de complemento)
Glomerulonefritis endocapilar	síndrome nefrítico, clásicamente 2 semanas después de una infección estreptocócica	disminución de C3 y C4 (consumo de complemento), puede asociarse a títulos de ASLO
Glomerulonefritis extracapilar (o con semilunas)	GN rápidamente progresiva, síndrome nefrítico	disminución de C3 y C4 (consumo de complemento), y/o AMBG, y/o ANCA

GN: glomerulonefritis, AUA: alteraciones urinarias asintomáticas, IgA: inmunoglobulina A, anti-PLA2R: anticuerpo anti receptor de fosfolipasa A2, ASLO: anti estreptolisina O. AMBG: anticuerpos anti membrana basal glomerular. ANCA: anticuerpos anti citoplasma de neutrófilos.

Las glomerulonefritis secundarias son debidas a un gran número de patologías sistémicas que pueden afectar al riñón de forma secundaria, y en estos casos el tratamiento va dirigido a tratar la enfermedad de base. En la tabla 2 se enumeran las principales enfermedades sistémicas que pueden ocasionar afectación renal (8).

Tabla 2 Principales enfermedades sistémicas que pueden ocasionar afectación renal

Enfermedad sistémica
Lupus
Vasculitis sistémicas
Microangiopatía trombótica: Síndrome hemolítico urémico y púrpura trombótica trombocitopénica
Esclerodermia
Disproteinemias: Mieloma múltiple, depósito de cadenas Ligeras y pesadas, amiloidosis
Artritis reumatoide
Síndrome de Sjogren
Crioglobulinemia
Síndrome antifosfolípidos
Sarcoidosis
Hepatitis víricas
Infección por virus de inmunodeficiencia humana

En los casos de glomerulonefritis secundarias el riñón puede cursar los mismos signos clínicos renales mencionados en las glomerulonefritis primarias, pero además, asociado a síntomas sistémicos. En algunos casos es necesaria la confirmación del diagnóstico mediante biopsia renal, en otros el diagnóstico sistémico es suficiente para hacer el diagnóstico de glomerulonefritis secundaria, aunque la biopsia puede estar indicada para hacer diagnóstico diferencial, valorar el grado de afectación renal y pronóstico de respuesta al tratamiento.

En Europa y Asia la glomerulonefritis más frecuente es la NlgA, mientras que en Estados Unidos y Canadá es la GSFS. Además de factores demográficos, se ha visto la influencia de factores socioeconómicos, países más ricos tienen más prevalencia de NlgA y los menos ricos de GNMP (4). En la Figura 2 se representa los principales diagnósticos de biopsias realizadas en España durante 1994-1999 (10).

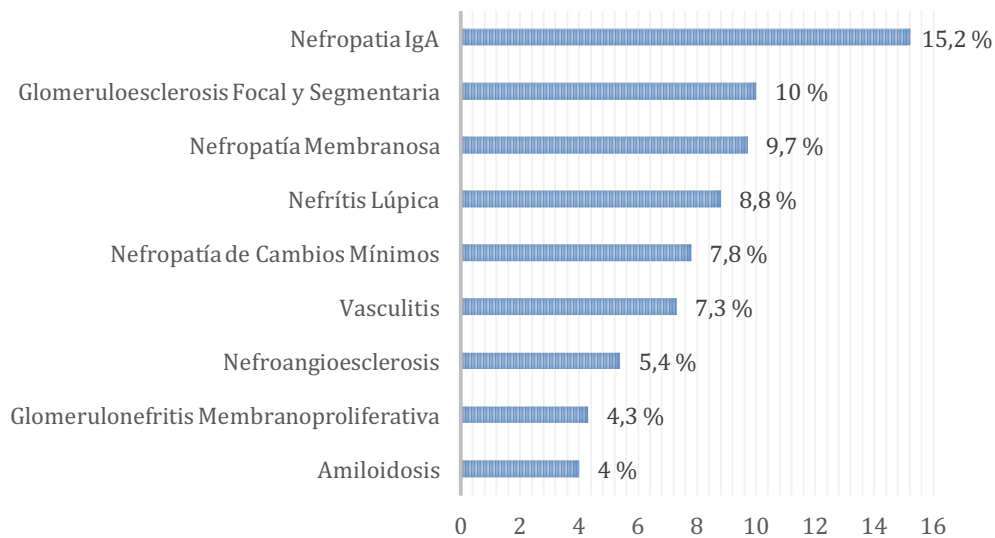


Figura 2 Principales diagnósticos de biopsias realizadas en España durante 1994-1999 (10)

2.1.Tratamiento de las glomerulonefritis

El tratamiento específico de las glomerulonefritis se basa principalmente en tratamiento inmunosupresor. La biopsia renal, además de confirmar el diagnóstico de la glomerulonefritis, aporta información sobre la potencial respuesta al tratamiento (mayor probabilidad de respuesta si existe predominancia de lesiones “activas” o agudas sobre crónicas). Incluso en ocasiones está indicado repetir la biopsia renal si existe una evolución desfavorable o no esperable según la historia natural de la enfermedad que requiera posible cambio de tratamiento (9).

Existe poca evidencia sobre el tratamiento de las glomerulonefritis, ya que son en su mayoría enfermedades raras o con evolución muy heterogénea. Las guías KDIGO 2012 representan el avance más importante para alcanzar un consenso para el tratamiento de estas enfermedades. Sin embargo, en sus recomendaciones para el tratamiento de glomerulonefritis primarias no existe ninguna recomendación con “grado de evidencia A” (evidencia de alta calidad), por lo que son necesarios más ensayos clínicos. Serían además necesarias herramientas que permitan estratificar el riesgo de progresión y enrolar poblaciones más homogéneas en los ensayos clínicos. En la tabla 3 se enumeran los tratamientos recomendados y los desaconsejados para las diferentes glomerulonefritis primarias (9).

Tabla 3 Tratamientos inmunosupresores recomendados y desaconsejados para el tratamiento de las glomerulonefritis primarias

GN Primaria	Inmunosupresores Recomendados	Inmunosupresores Desaconsejados
Nefropatía de cambios mínimos	Corticosteroides Ciclofosfamida o Clorambucilo Levamisol Ciclosporina o Tacrólimus Micofenolato Mofetilo Rituximab	Mizoribine Azatioprina Ciclofosfamida (si hay residencia a esteroides)
Nefropatía IgA (NlgA)	Corticosteroides Ciclofosfamida o Azatioprina (solo si GN rápidamente progresiva con semilunas en la biopsia renal)	Micofenolato Mofetilo
Nefropatía membranosa	Corticosteroides Ciclofosfamida Clorambucilo Ciclosporina o Tacrólimus	Corticosteroides en monoterapia Micofenolato Mofetilo en monoterapia
Glomeruloesclerosis focal y segmentaria (GSFS)	Corticosteroides Ciclosporina Micofenolato Mofetilo	
Glomerulonefritis membranoproliferativa (GNMP)	Corticosteroides Ciclofosfamida Micofenolato Mofetilo	
Glomerulonefritis endocapilar	Antibióticos Corticosteroides (no hay evidencia)	
Glomerulonefritis extracapilar (o con Semilunas)	Corticosteroides Ciclofosfamida Rituximab Azatioprina Micofenolato Mofetilo Metrotexato	Etanercept (en GN pauciimmune)

GN: glomerulonefritis

Además del tratamiento específico, existe un tratamiento no específico de las glomerulonefritis, que deben recibir principalmente los pacientes con alto riesgo de progresión (tabla 4). La finalidad de este tratamiento es disminuir los mecanismos no específicos que pueden contribuir a la progresión de la ERC y tratar las complicaciones (tabla 5) (4, 7).

Tabla 4 Factores de riesgo de progresión de la enfermedad renal crónica en pacientes con glomerulonefritis

Factores de riesgo de progresión
Hipertensión Arterial
Proteinuria: >1 g/día en NIgA >3,5 g/día en GSFS, nefropatía membranosa y GNMP
Filtrado Glomerular disminuido al momento del diagnóstico de la GN
Lesiones crónicas en la biopsia renal: Glomeruloesclerosis Fibrosis túbulo intersticial
Hábito tabáquico, Obesidad
Asociación con otras enfermedades que puedan producir daño renal (Diabetes, HTA, entre otros)

NIgA: nefropatía IgA, GSFS: glomeruloesclerosis focal y segmentaria, GNMP: glomerulonefritis membranoproliferativa, GN: glomerulonefritis, HTA: hipertensión arterial.

Tabla 5 Tratamiento no específico de las glomerulonefritis

Tratamiento no específico	Medidas
Control de la HTA	Tensión arterial sistólica 120-129 mmHg Suspender calcio antagonistas dihidropiridínicos (a menos que sean necesarios para alcanzar el objetivo de tensión arterial)
Tratamiento antiproteinúrico	Inhibición del sistema renina-angiotensina con: Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA) o antagonistas de receptor de angiotensina 2 (ARA2)
Dieta	Ingesta de proteínas de 0,8 – 1 g/Kg/día Disminuir la ingesta de sal
Edemas	Iniciar tratamiento diurético (asociado a dieta sin sal)
Otros	Abandono de hábito tabáquico Control de la obesidad, ejercicio físico regular Control del metabolismo calcio-fósforo Control de la anemia Control de las alteraciones iónicas Control de acidosis metabólica Control de la dislipemia Prevenir infecciones relacionadas con el tratamiento inmunosupresor: vacunas, profilaxis antibiótica Profilaxis antitrombótica en caso de síndrome nefrótico, especialmente si albúmina sérica menor de <2 g/dl o pacientes encamados

2.2. Patogenia de las glomerulonefritis

La patogenia de las glomerulonefritis es compleja, en primer lugar, muchos tipos de insultos pueden iniciar una glomerulonefritis, ya sean factores internos como autoinmunidad, cáncer, anomalías ultraestructurales en el riñón, o factores externos como infecciones, tóxicos o fármacos. En segundo lugar, es probable que existan factores genéticos que en presencia de elementos precipitantes predispongan al desarrollo o progresión de la enfermedad, o incluso, interfieran con la respuesta al tratamiento (11, 12); Y en tercer lugar existen interacciones complejas entre factores solubles (anticuerpos, complemento, quimioquinas, citoquinas y factores de crecimiento) y células (tanto sistémicas como células intrínsecas del riñón) que median la inflamación glomerular. Además de esto, la existencia de factores inespecíficos como hipertensión, hiperglucemia y proteinuria pueden promover el daño crónico, independientemente de que se haya resuelto el insulto inicial (12).

El daño glomerular se produce por la acción de los elementos que intervienen en la respuesta inmune, tanto respuesta innata (inmediata, inespecífica, no crea memoria) como respuesta adaptativa (más tardía, específica para un antígeno, crea memoria para futuros contactos con mismo antígeno). A su vez la respuesta inmune adaptativa se divide en 2 brazos, la respuesta humoral que produce activación de linfocitos B, depósito de inmunoglobulinas y activación del complemento en el glomérulo; y la respuesta celular que induce infiltración local y sistémica de células mononucleares (linfocitos y macrófagos) y favorece la formación de semilunas en el glomérulo (13).

Aunque la base de la patogenia suele ser inmunológica, la morfología de las enfermedades glomerulares es muy heterogénea y oscila desde la normalidad óptica del síndrome nefrótico de la nefropatía por cambios mínimos al exceso de células de la glomerulonefritis endocapilar y a la práctica sustitución del ovillo glomerular por matriz extracelular acelular en los estadios avanzados de obsolescencia glomerular (11).

La variabilidad en la morfología y forma de presentación de las glomerulonefritis dependerá principalmente de si existe o no depósito de inmunocomplejos y de la localización del daño dentro del glomérulo: podocitos, células endoteliales o células mesangiales (13).

La mayoría de las glomerulonefritis cursan con depósito de inmunocomplejos (como la NlgA, nefropatía membranosa, glomerulonefritis endocapilar, nefritis lúpica, glomerulonefritis AMBG, entre otros). Estos inmunocomplejos se encuentran depositados en el glomérulo por varias razones:

1. Anticuerpos que reaccionan contra antígenos que son componentes normales del glomérulo, como ocurre en la glomerulonefritis AMBG, en la que anticuerpos se unen al dominio NC1 de las cadenas $\alpha 3$ y $\alpha 4$ del colágeno IV (un componente de la membrana basal glomerular, y también membrana alveolar, por lo que puede asociarse a síntomas pulmonares). También en la nefropatía membranosa primaria existe un anticuerpo específico IgG4 contra el receptor de la fosfolipasa A2 (PLA2R) de la membrana del podocito, que forma inmunocomplejos en el espacio subepitelial (11, 12, 14).
2. Complejos inmunes sistémicos con afinidad por el riñón precipitan en el tejido renal, como ocurre en la glomerulonefritis endocapilar, nefritis lúpica, nefropatía membranosa secundaria a tumores y en la glomerulonefritis crioglobulinémica relacionadas con VHC (11, 12).
3. Una anormal glicosilación de la IgA1 favorece tanto su depósito mesangial como la generación de autoanticuerpos IgG frente a la IgA lo que origina el depósito mesangial de IgA e IgG en la nefropatía IgA (11, 15).

En estos casos los inmunocomplejos se comportan como evento iniciador de las glomerulonefritis, el anticuerpo depositado causa daño porque, por un lado, interfiere con las funciones de las células glomerulares, y por otro conduce a la inflamación glomerular promoviendo la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos, activando la infiltración celular o proliferación de células intrínsecas renales a través de receptores Fc, o fijando y activando complemento (12).

La activación del complemento estimulada por las Inmunoglobulinas, que forman parte de los inmunocomplejos puede ocurrir por 3 vías, clásica, alternativa o de las lectinas. La unión de IgG (excepto IgG4) e IgM activa la vía clásica. La vía alternativa se activa principalmente por productos microbianos, pero también ciertas inmunoglobulinas como, como IgA e IgE agregadas y ciertas IgG (11). En la nefropatía membranosa, la IgG4 antiPLA2R (que no puede activar la vía clásica) activa el complemento a través de la vía de las lectinas (16).

La activación del complemento por cualquiera de las tres vías libera fragmentos y ensambla un terminal común, el llamado complejo de ataque a la membrana (CAM, C5b-9). El CAM es un canal transmembrana, que ataca podocitos, células mesangiales y endoteliales; y que puede lisar la célula o causar una lesión sublítica que conduce a la muerte por apoptosis o a la secreción de mediadores de la inflamación (11).

Además de la formación del CAM, la activación del complemento origina también fragmentos con propiedades quimiotácticas, como el factor quimiotáctico C5a, que produce reclutamiento células inflamatorias como neutrófilos, eosinófilos, monocitos, linfocitos T y células fagocíticas con liberación de enzimas granulares, y generación de oxidantes que contribuyen al daño glomerular (17).

Mutaciones de genes que codifican proteínas del complemento causan microangiopatía trombótica y glomerulonefritis por depósito de C3. El término glomerulopatía por C3 se ha propuesto para los trastornos glomerulares que son causados principalmente por mutaciones o autoanticuerpos contra proteínas reguladoras (CFH, CFI) o autoanticuerpos como el factor nefrítico que favorecen una activación continua del complemento (11, 18).

Existen otras glomerulonefritis que no cursan con depósito de inmunocomplejos (como en la nefropatía de cambios mínimos, GSFS y glomerulonefritis asociada a ANCA). En estas el mecanismo iniciador de la respuesta inmune puede variar:

1. En las glomerulonefritis asociadas a ANCA, aunque es mediada por anticuerpos, no existe depósito de inmunocomplejos. Los ANCA son anticuerpos que van dirigidos contra proteasas catiónicas localizadas en los gránulos de los neutrófilos, que se muestran en la superficie celular en respuesta a ciertas citoquinas. Los anticuerpos pueden ir dirigidos contra la proteinasa 3, que toma en el neutrófilo fijado una distribución citoplasmática en la inmunofluorescencia indirecta (cANCA), o contra la mieloperoxidasa, que toma una distribución perinuclear (pANCA) (12). El efecto activador de los ANCA sobre los neutrófilos está mediado por receptores Fc (11), y además en este tipo de glomerulonefritis se ha demostrado que la unión de ANCA al receptor de C5a del complemento produce activación de los neutrófilos y puede ser el factor iniciador de la respuesta inmune en este tipo de glomerulonefritis (19, 20).
2. En la NCM y en la GSFS primaria se ha propuesto la existencia de un “factor circulante” que pueda ser el causante de la enfermedad. Esta teoría se sustenta en varios hechos, por ejemplo, se ha visto en que pacientes con GSFS presentan una rápida recurrencia de la enfermedad al ser trasplantados (21). El mecanismo por el que este factor circulante causa daño glomerular en estas glomerulonefritis es desconocido, pero se ha propuesto que pueda causar alteración en la estructura y función del diafragma de filtración (22). En la búsqueda de este factor circulante se han descrito varios candidatos: cardiotrophin-like cytokine-1 (CLC-1) y el receptor de uroquinasa soluble (suPAR) en GSFS, hemopexina y factor de permeabilidad vascular en la NCM. Los niveles séricos de suPAR son altos en el 66% de pacientes con GSFS, suPAR activa la integrina $\beta(3)$ podocitaria causando fusión de pedicelos y proteinuria (11).
3. Mutaciones de genes que codifican proteínas del podocito pueden causar GSFS primarias (23).

Además de la existencia o no de depósito de inmunocomplejos, la localización del daño en el glomérulo también va a determinar la presentación clínica de la glomerulonefritis ya que se activarán mecanismos diferentes de daño renal, en la figura 3 se señalan las principales localizaciones del daño glomerular en las glomerulonefritis: podocito, célula endotelial, célula mesangial y membrana basal (13).

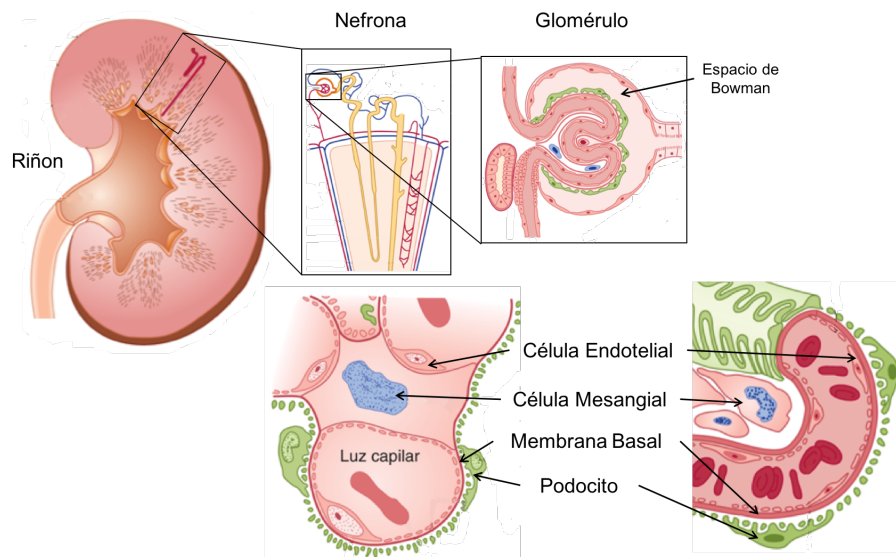


Figura 3 Estructura del glomérulo y principales localizaciones del daño glomerular

En la figura 4 se muestra un resumen de la patogenia de las glomerulonefritis. La localización de la lesión clasifica a las glomerulonefritis en inflamatorias o no inflamatorias.

- El daño del **podocito** (célula epitelial) o el depósito de inmunocomplejo en el **espacio subepitelial** (entre membrana basal y podocito), al estar separado de la circulación (dirigido hacia la capsula de Bowman), no produce reclutamiento de células inflamatorias desde la circulación, por lo que el mecanismo de producción de daño glomerular es **no inflamatorio**. La lesión del podocito produce incremento en la permeabilidad de la barrera de filtración glomerular, que clínicamente se expresa como proteinuria o síndrome nefrótico (13).
- Si el daño ocurre en las **células mesangiales, endoteliales** o en el **espacio subendotelial** de la membrana basal, al estar en contacto con la

circulación, se activará el **mecanismo inflamatorio** de daño glomerular, que incluye activación en infiltración de células inflamatorias, como neutrófilos (que liberan oxidantes y proteasas), macrófagos (además de proteasas y oxidantes, liberan factor tisular y TGF- β), linfocitos T y plaquetas (producen trombosis intraglomerular y liberan el factor de crecimiento derivado de plaquetas o PDGF, que contribuye a la proliferación mesangial y estimula la proliferación de células glomerulares) (13, 24, 25). La lesión de células mesangiales y endoteliales se manifiesta clínicamente por hematuria con hematíes dismórficos (incluso puede haber cilindros hemáticos), en algunos casos leucocituria, proteinuria de cuantía variable y dependiendo de la severidad del cuadro puede haber disminución del filtrado glomerular. La proliferación de células epiteliales parietales es lo que produce las semilunas y puede ocurrir en todas las glomerulonefritis (13).

En ambos grupos, nefropatías glomerulares inflamatorias y no inflamatorias, se produce lesión del glomérulo que, a través de proliferación y activación de células renales intrínsecas (parietales, endoteliales y mesangiales) y/o infiltración de células inflamatorias sistémicas; producen activación del complemento, segregación de citoquinas inflamatorias (TNF, Tweak), citoquinas profibróticas (TGF- β) y quimioquinas que agravan y prolongan el daño glomerular, y a su vez estimulan la activación y proliferación de células glomerulares.

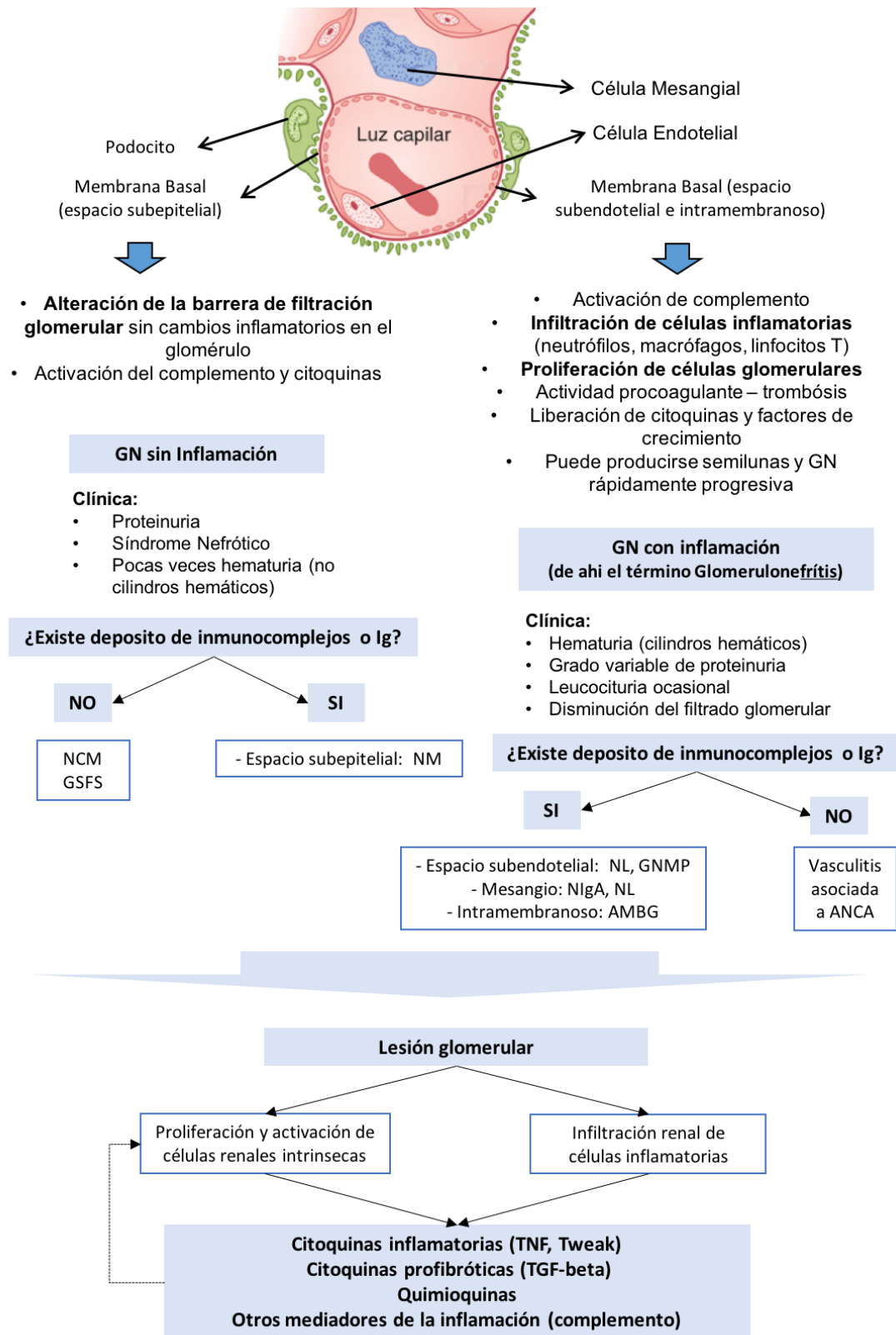


Figura 4 Esquema de patogenia de las glomerulonefritis, tipos de mecanismos de daño glomerular y tipo de respuesta inmune implicada en el daño glomerular

3. Biomarcadores para el estudio de la ERC

En la práctica clínica habitual la biopsia renal es considerada el método más valioso para el estudio de las glomerulonefritis, tanto para confirmar diagnóstico, como para determinar la intensidad de tratamiento en función del grado de cronicidad de las lesiones en la biopsia, y para estimar el pronóstico renal. Sin embargo, al ser un procedimiento invasivo implica ciertos riesgos y además requiere tiempo, recursos y personal médico entrenado para su interpretación, por lo que no se realiza de forma rutinaria en el seguimiento de progresión y evaluación de respuesta al tratamiento.

No obstante, los criterios diagnósticos de la biopsia renal son fundamentalmente morfológicos y es probable que varias vías patogénicas cursen con similares cambios morfológicos, pero requieran abordajes terapéuticos diferentes. En este sentido existe grandes esperanzas depositadas en aproximaciones basadas en la biología de sistemas a fin de individualizar el tratamiento.

En vista de esto, es razonable pensar en la búsqueda de indicadores, que faciliten el estudio de ciertas patologías y la monitorización de la respuesta al tratamiento. Así resurge el estudio de los marcadores biológicos o “biomarcadores”. En el año 2011, un grupo de expertos convocados por el NIH (National Institute of Health) llamado grupo de trabajo para definición de biomarcadores (Biomarkers Definitions Working Group) se reunieron para establecer las características necesarias para llamar a una molécula “biomarcador” (26).

Los biomarcadores son moléculas que se pueden medir y evaluar objetivamente como indicadores de procesos biológicos normales, procesos patogénicos o respuesta a una intervención terapéutica (26). El uso de biomarcadores no es novedad en medicina, los usamos todos los días en la práctica clínica habitual. En ese sentido, la creatinina sérica y albuminuria son biomarcadores de función renal y de lesión renal, respectivamente. Entre las utilidades de los biomarcadores se puede mencionar:

1. Como herramienta de diagnóstico de una enfermedad o condición anormal (por ejemplo, concentración elevada de glucosa en sangre para el diagnóstico de diabetes mellitus).
2. Como una herramienta para la estadificación de una enfermedad (por ejemplo, mediciones de antígeno carcinoembrionario para diversos cánceres).
3. Para clasificar la extensión de una enfermedad (por ejemplo, concentración específica de antígeno prostático en sangre utilizada para reflejar la extensión del crecimiento del tumor y la metástasis)
4. Como indicador del pronóstico de una enfermedad (por ejemplo, para medición anatómica del encogimiento de tumores)
5. Para la predicción y monitoreo de respuesta a un tratamiento (por ejemplo, la concentración de colesterol para la determinación del riesgo cardiovascular).

Sin embargo, estamos en la era de la medicina personalizada, notables avances genómicos y proteómicos nos han ayudado en la comprensión de la salud y la enfermedad. Con la medicina personalizada se promueve una determinación más precisa de la predisposición, el diagnóstico y el pronóstico de las enfermedades, las intervenciones preventivas y terapéuticas más precoces, un proceso de desarrollo de fármacos más eficiente y un tratamiento más seguro. Los biomarcadores son herramientas esenciales para la implementación de la medicina personalizada. La disponibilidad de herramientas para explorar tanto el genoma como el proteoma de un organismo han revolucionado y acelerado enormemente el descubrimiento de biomarcadores. Gracias a estos avances se han descubierto biomarcadores en la enfermedad renal, que permiten predecir lesión renal y riesgo de progresión de ERC, por ejemplo, la Kidney Injury Molecule 1 (KIM-1) urinaria y Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) urinaria, son marcadores de daño tubular, fracaso renal agudo (FRA) y están aumentadas en ERC (27). Incluso se han descrito paneles de biomarcadores como el marcador proteómico urinario CKD273, compuesto por 273 péptidos (28). nephrocheck

En la búsqueda de biomarcadores se deben tener en cuenta las características ideales de un biomarcador (29):

1. No invasivos, fáciles de medir, económicos y producir resultados rápidos.
2. Fuentes fácilmente disponibles, como sangre u orina
3. Tener una alta sensibilidad y especificidad
4. Los niveles deben variar rápidamente en respuesta al tratamiento
5. Los niveles de biomarcadores deben ayudar a la estratificación del riesgo y poseer valor pronóstico.
6. Deben ser biológicamente plausibles y proporcionar una visión del mecanismo de la enfermedad subyacente.

3.1.¿Por qué necesitamos biomarcadores en la ERC?

Actualmente el diagnóstico de ERC está limitado a dos parámetros fundamentales, comentados en el apartado “enfermedad renal crónica”, que son: disminución del filtrado glomerular ($<60\text{ml/min/1.73 m}^2$), o albuminuria ($>30\text{ mg/día}$ o $>30\text{ mg/g}$ de creatinina). Existen otros criterios, pero son estos dos parámetros los principales. Pensar que la función renal normal, medida como filtrado glomerular estimado, es $120\text{ ml/min/1.73 m}^2$ y hasta que no baja a $60\text{ ml/min/1.73 m}^2$, o hasta que la albuminuria no sube a 30 mg/día , no se hace diagnóstico de ERC, nos indica que los criterios diagnósticos actuales de ERC son tardíos: existe un daño inicial que progresa sin ser diagnosticado hasta que se ha perdido la mitad del filtrado glomerular o hasta que la albuminuria ha subido entre 10 y 15 veces por encima de los valores fisiológicos, por ello podemos postular que existe un punto ciego, y que antes de que diagnostiquemos ERC ya debe haber variaciones en el riñón que no estamos detectando, y que podrían revelar tempranamente los pacientes que van a desarrollar ERC en un futuro, por lo que necesitamos marcadores que pronostiquen la ERC antes de que suceda, que diagnostiquen a los pacientes en el punto ciego (figura 5) (29).

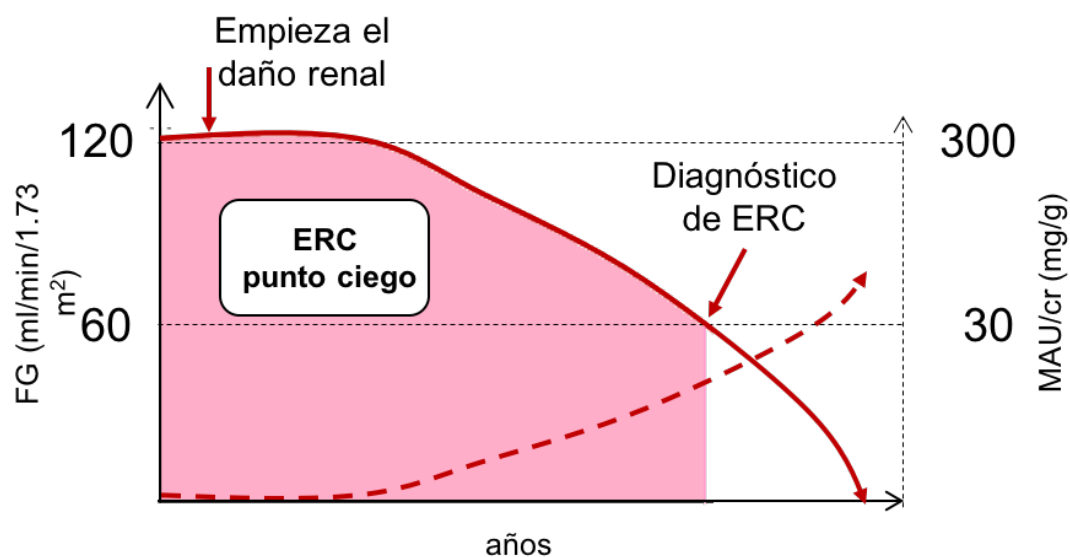


Figura 5 Diagnóstico de ERC y el punto ciego

En relación con la ERC, podríamos medir biomarcadores en sangre o en orina, en sangre puede reflejar la acumulación de moléculas en la circulación o marcadores de daño vascular; y en orina pueden eliminarse marcadores de daño glomerular o tubular, mediadores de proceso de cicatrización renal o componentes de la matriz extracelular que se acumula en riñones fibrosados. En el estudio de las glomerulonefritis, los biomarcadores podrían complementar la información obtenida en la biopsia renal, permitiendo la monitorización de la lesión renal evitando repetir la biopsia renal e incluso podrían evitar su realización.

4. Súper Familia TGF- β

La superfamilia del factor de crecimiento transformante humano β (TGF- β) está codificada por 33 genes y comprende más de 33 proteínas. Sobre la base de su similitud de secuencia y función, se agrupan en subfamilias: TGF β s, activinas, factor de crecimiento y diferenciación NODAL, proteínas morfogénicas óseas (BMPs), factores de crecimiento y diferenciación (GDFs) y la hormona anti-Mülleriana (AMH). Colectivamente los BMPs, activinas, NODAL y GDFs reciben el nombre de BANGs (figura 6) (30).

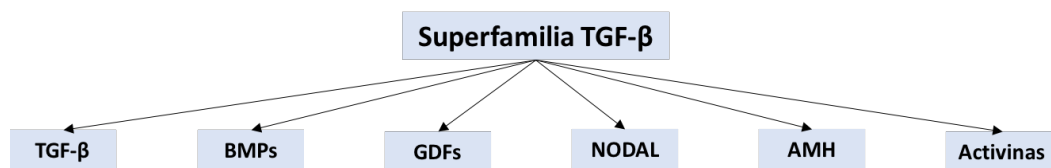


Figura 6 Subfamilias de la superfamilia TGF-β

Los miembros de esta superfamilia se encuentran en todos los metazoos y surgieron con la multicelularidad, siendo las familias activinas y BMPs las más antiguas. En todos los casos, los ligandos se sintetizan como precursores, con un gran pro-péptido y un péptido maduro carboxi-terminal, donde hay siete cisteínas carboxi-terminales conservadas que forman un nudo de cisteína (cysteine knot). Ciertas proteínas convertasas escinden los ligandos maduros del precursor y estos forman homo o heterodímeros y se mantienen unidos por enlaces disulfuro (figura 7) (30).

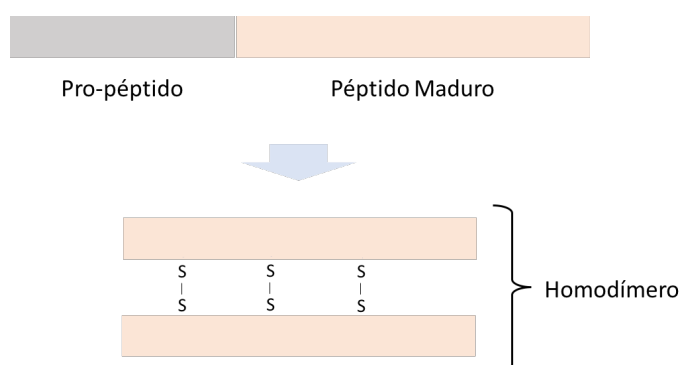


Figura 7 Esquema general de las proteínas de la superfamilia TGF β, todas se sintetizan como un pro-péptido. El péptido maduro carboxiterminal es escindido por proteínas convertasas y los péptidos maduros forman dímeros unidos mediante enlaces disulfuro.

El mecanismo de señalización para todos los ligandos de esta superfamilia es fundamentalmente el mismo. Cada ligando requiere dos tipos de receptores localizados en la membrana plasmática, tipo I y tipo II. Algunos ligandos también necesitan correceptores para formar el complejo “receptor activado”. Se han identificado 7 receptores tipo I y 5 receptores tipo II (31). Los ligandos se unen al receptor tipo II. El receptor tipo II fosforila al receptor tipo I y proporciona un sitio de unión para los SMADs. Los SMADs son las principales moléculas de señalización para los miembros de la superfamilia TGF-β, aunque pueden producir señalización

independientemente de SMADs (31). Diferentes ligandos de la superfamilia activan diferentes SMADs: TGF β s, activinas y NODAL activan SMADs 2 y 3; BMPs y GDFs activan SMADs 1, 5 y 8. Los SMADs también reciben el nombre de R-SMADS o SMADs regulados por receptor. Los R-SMADs fosforilados forman un complejo multimérico con co-SMADs (SMAD-4), y migran al núcleo para regular la transcripción de ADN tanto positiva como negativamente. También existen SMADs inhibidores (SMAD 6 y 7) que compiten con los SMADs activadores e inhiben la señalización (figura 8) (30-33). La vía de señalización mediante SMADs no es exclusiva de la superfamilia TGF- β . También interacciona con numerosas moléculas de señalización, que pueden modificar la respuesta (31, 32).

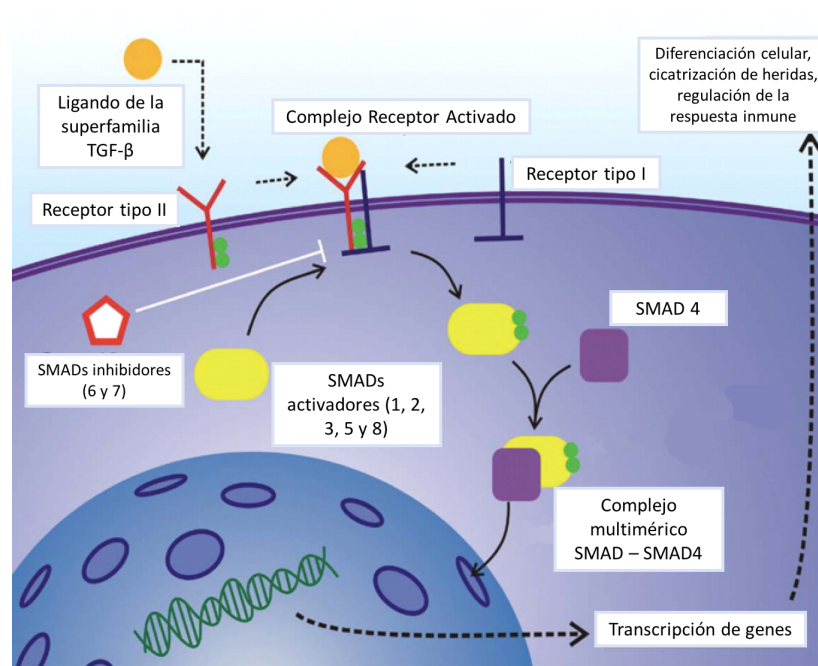


Figura 8 Esquema de señalización de la superfamilia TGF β

Los miembros de esta superfamilia tienen un papel crucial en la diferenciación celular, desarrollo de órganos durante la embriogénesis, cicatrización de heridas y regulación de la respuesta inmune. Forman parte del elaborado sistema de comunicación intercelular para coordinar las acciones celulares de los organismos multicelulares. Esta coordinación es necesario para la reparación de tejidos dañados y la integración de la respuesta inmunológica, tanto en tiempo como en localización geográfica de la lesión (31, 34, 35).

La subfamilia más estudiada es la TGF- β , que comprende 3 miembros identificados hasta ahora TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3. De ellos el mejor conocido es el TGF- β 1. Están presentes sólo en vertebrados y son necesarios para el desarrollo adecuado de varios órganos y tejidos, incluyendo el corazón, los pulmones, los ojos y el paladar. También realizan funciones esenciales para la supervivencia a largo plazo de los seres humanos y otros vertebrados superiores, incluyendo la regulación del sistema inmune adaptativo y la coordinación de la cicatrización de heridas. La desregulación de la vía TGF- β conduce a una serie de enfermedades y trastornos humanos, incluyendo la fibrosis y el cáncer (36). Las moléculas de la familia TGF- β exhiben tanto efectos proinflamatorios como anti-inflamatorios en las respuestas inmunes. El TGF- β 1 induce fibrosis extensa y el TGF- β 3 contrarresta la fibrosis tisular, por lo que el equilibrio entre el TGF- β 1 pro-fibrótico y el TGF- β 3 anti-fibrótico determina el destino del órgano después de la inflamación (35).

Los BANGs tienen papeles cruciales en el desarrollo temprano de vertebrados. NODAL y BMPs ayudan a establecer ejes embrionarios, participan en la formación de mesodermo y endodermo, y regulan la transición epitelio-mesenquimal. En fases posteriores de desarrollo, las BMPs y los GDFs son necesarios para la formación de muchos tejidos y órganos, como extremidades, dientes, riñón, piel, músculo, vascular, hematopoyético y neuronal. En el adulto las BMPs y GDFs son esenciales para la homeostasis tisular, regulación de las células madre somáticas y control de la diferenciación. Por el contrario, NODAL se expresa predominantemente en el adulto en contextos patológicos (30).

4.1. Súper familia TGF- β en la ERC

La citoquina de esta familia mejor caracterizada en la ERC es el TGF- β 1. En un primer momento el TGF- β 1 limita el daño glomerular después de una lesión aguda, al inhibir la función de los macrófagos, pero cuando la inflamación o agresión persiste, pueden facilitar el desarrollo de fibrosis renal (32).

El TGF- β 1 es la principal citoquina fibrogénica en la ERC. TGF- β 1 regula aspectos críticos de la función celular que pueden mediar el desarrollo de insuficiencia renal: (32).

- Apoptosis de podocitos (37), puede causar podocitopenia.
- Acumulación de matriz extracelular, expansión mesangial y fibrosis tubulointersticial.

En un estudio con 1.157 pacientes con ERC por diferentes causas, el TGF- β medido en plasma se asoció con ERC secundaria a glomerulonefritis y con mayor mortalidad (38). En pacientes con proteinuria intensa TGF- β 1 se expresaba principalmente en células epiteliales tubulares, y la eliminación urinaria fue mayor en pacientes con proteinuria que en controles (39). TGF- β en orina permitió diferenciar entre GSFS y nefropatía de cambios mínimos (40).

En vista de esto, se han hecho ensayos clínicos de anticuerpos neutralizantes anti TGF- β en GSFS, bien tolerado en fase 1 (41), pero no han sido publicados los resultados del ensayo clínico fase 2, que fue completado y acabó en agosto 2015 (42).

5. *GDF15*

El “Growth/differentiation factor-15” o GDF15, fue descubierto a finales de los años 90 en al menos 7 laboratorios diferentes de forma independiente, por lo que ha recibido muchos nombres: MIC-1 (macrophage inhibitory cytokine-1), NAG-1 (NSAID activated gene), PLAB (placental bone morphogenetic protein) y PTGFB (Placental Transforming Growth Factor Beta). Se trata de una molécula con propiedades anti-inflamatorias, anti-proliferativas y anti-tumorigénicas (43).

La proteína del GDF15 contienen las características estructurales de los miembros de la familia TGF- β , la proteína inicial consta de 295 aminoácidos y 62 kDa que contienen un péptido señal de 16 aminoácidos, un propéptido de 167 aminoácidos y una proteína madura carboxiterminal de 112 aminoácidos. Es procesada por una proteasa de tipo furina y secretada como un dímero de 25 kDa (figura 9) (43).

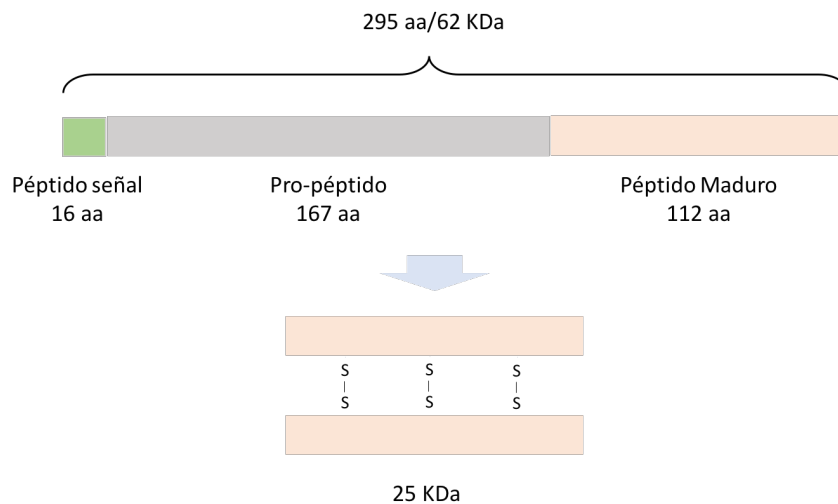


Figura 9 Estructura de la proteína GDF15

GDF15 se expresa en diversas células como macrófagos, células musculares lisas vasculares, adipocitos, cardiomiocitos, células endoteliales, fibroblastos, tejido prostático, mucosa intestinal, sistema nervioso central y periférico, donde se ha demostrado que desempeñan un papel importante en la regulación de la respuesta inflamatoria, el crecimiento y la diferenciación celular (43, 44). En el riñón se expresa principalmente en el segmento S3 del túbulo proximal y los conductos colectores (43).

Hasta hace poco se desconocían los receptores y vías de señalización que utiliza GDF15. Hoy se sabe que utiliza el mismo mecanismo de señalización que el descrito para la súper familia TGF- β . El receptor tipo II que utiliza es el TGF β R-2 (30), y como receptor tipo I utiliza el activin receptor-like kinase-1 (ALK1) (45). En relación a la vía de señalización, utiliza también SMADs 1, 5 y 8 como el resto de la subfamilia GDF (30).

GDF15 desempeña un papel clave en el desarrollo prenatal, regulación de respuestas celulares al estrés e inflamación y reparación de tejidos después de lesiones graves en la vida adulta como cerebro, hueso, corazón, hígado, pulmón, riñón y otros (46). Tiene un papel prominente en el desarrollo, proliferación celular, diferenciación, y reparación de la matriz extracelular (47). En un estudio con 874 varones y 324 gemelos del mismo sexo (69% mujeres) en un seguimiento de 14 años, los niveles séricos elevados de GDF15 fueron predictores de mortalidad por todas las causas

independientemente de factores genéticos, sin embargo los pacientes con GDF15 más altos eran más ancianos y tenían más evidencia de inflamación sistémica, por otra parte no se midió ni se ajustó por filtrado glomerular (48). Además, la desregulación de la expresión de GDF15 se ha asociado con diversas enfermedades humanas y progresión del cáncer:

- **Cáncer:** GDF15 tiene diferentes efectos dependiendo de la etapa de desarrollo del cáncer, mostrando en las primeras etapas acciones anti-tumorales; y en etapas finales promoviendo la invasión y metástasis de células cancerígenas. (46). Los niveles séricos elevados se han relacionado con enfermedad metastásica ósea en varios tipos de cáncer, próstata, mama, pulmón y colorectal (49). Un metaanálisis demostró que los niveles séricos de GDF15 son mayores en pacientes con carcinoma colorectal en comparación con controles sanos, con una sensibilidad de 58% y especificidad de 92% (valor de corte de GDF15 1099 pg/ml) y también mayores niveles de GDF15 se asociaron a peor supervivencia global (50). Además, en este tipo de pacientes, los niveles séricos de GDF15 permiten la monitorización de recurrencia de metástasis hepáticas (51). En cáncer de ovario epitelial la expresión sérica y en tejidos (medido mediante inmunohistoquímica) se relacionó con peor supervivencia libre de progresión (52). En pacientes con Mieloma múltiple, GDF15 se encontraba aumentado en sangre y se relacionó con peor pronóstico (53). Medidos en orina, después de la realización de masaje prostático, los niveles de GDF15 junto a otros 6 biomarcadores (de un total de 42 medidos) fueron predictores independientes para cáncer de próstata (54).
- **Enfermedades cardiovasculares:** Los niveles elevados de GDF15 predicen eventos ateroscleróticos independientemente de los factores de riesgo tradicionales (55). GDF15 sérico demostró una sensibilidad del 80% y especificidad del 92% en la predicción de enfermedad arterial coronaria diagnosticada por angiografía (estrechez mayor al 50% en algún vaso coronario, no diagnosticada ni tratada previamente) y además mayores niveles de GDF15 se asociaron con mayor severidad de la enfermedad arterial coronaria (56). En pacientes con HTA, sin antecedentes de accidentes vasculares cerebrales, los

niveles séricos elevados de GDF15 fueron predictores independientes del primer evento de accidente vascular cerebral, principalmente los de origen isquémico (57). En un metaanálisis se concluyó que los altos niveles plasmáticos de GDF-15 se asocian con un mayor riesgo de mortalidad e infarto de miocardio recurrente en pacientes con síndrome coronario agudo (58). Fue un valioso predictor de la muerte por causa cardiovascular en una población de pacientes con enfermedad coronaria después de una intervención coronaria percutánea (59).

- Diabetes Mellitus: los niveles séricos de GDF15 se relacionaron con el tratamiento con metformina y su concentración reflejó la dosis de metformina, a mayor dosis niveles más altos (60). La hiperglucemia (después de una sobrecarga oral de glucosa) incrementa los niveles séricos de GDF15, y además en cultivos celulares de células humanas de cáncer hepático (HepG2) la administración de glucosa e insulina estimuló la liberación de GDF15 (61).
- Fibrosis hepática: combinado con otros biomarcadores séricos: placental Growth factor (PLGF) y hepatic growth factor (HGF), los niveles de GDF15 reflejaron la presencia de fibrosis hepática significativa detectada por elastografía e histología y también identificaron a los pacientes en riesgo que presentaban valores bajos en la elastografía (62).
- Fibrosis pulmonar: En pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica, los altos niveles séricos de GDF15 se asociaron con una mayor tasa anual de exacerbaciones, una mayor mortalidad y una mayor disminución tanto del volumen espiratorio forzado en 1s como de la capacidad vital forzada (63). El GDF15 participa en la senescencia epitelial e inflamación crónica de las vías respiratorias inducida por el humo del cigarrillo, por lo que favorece el desarrollo y progresión de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, esto se determinó de 3 formas: GDF15 se encontraba aumentado en células epiteliales de fumadores en comparación con no fumadores, la supresión de GDF15 inhibió el daño epitelial y finalmente la administración de GDF15 promovió el daño epitelial en cultivos celulares (45).

- Demencia: Los niveles séricos de GDF15 pueden diferenciar entre deterioro cognitivo no demencia y enfermedad de Alzheimer en pacientes con hiperintensidad de sustancia blanca (64), y medidos en líquido cefalorraquídeo, los niveles de GDF15 permiten diferenciar entre pacientes con enfermedad de párkinson con y sin demencia (47).
- Pre eclampsia: El GDF15 sérico aumentó con la edad de gestación, alcanzando el nivel más alto en el tercer trimestre. Se redujo significativamente en el tercer trimestre en mujeres con preeclampsia, especialmente en los casos de aparición tardía. Sin embargo, no se alteró en el primer trimestre en mujeres destinadas a desarrollar preeclampsia de inicio tardío (65).

Los factores desencadenantes de la producción de GDF-15 son el estrés biomecánico, isquemia, anoxia y citocinas inflamatorias (factor de necrosis tumoral alfa, interleucinas (IL) -2, IL-4, IL-6), angiotensina II, factor estimulante de colonias de macrófagos y TGF- β . Entre los objetivos moleculares directos de GDF-15 destaca la proteína p53, que es inducida por estrés oxidativo y tiene efectos anti-apoptóticos sobre las células diana (44).

5.1.GDF15 como biomarcador renal

Datos preclínicos muestran que GDF15 tiene efectos protectores en el riñón. Los ratones knock-out para GDF15 comparados con ratones “wild type”, ambos con diabetes tipo 1 y tipo 2, presentaron mayor daño intersticial (observado en la biopsia), y clínicamente mayor glucosuria y poliuria. Llamativamente los autores no midieron hemoglobina glicosilada por lo que no sabemos si el mayor daño renal en los ratones GDF15 knock-out se debe a que GDF15 tiene un efecto nefroprotector intrínseco o a que los ratones GDF15 knock-out tenían una diabetes más grave (66). En ratones la expresión renal de GDF15 aumentó de forma temprana en respuesta diversos modelos de daño renal: nefrectomía parcial (modelo de necrosis e inflamación), isquemia-reperfusión renal (mediante el pinzamiento de arteria y vena renal por 60 min, induce apoptosis, inflamación y daño oxidativo) y tras administración de CCl₄ (tetracloruro de carbono, induce apoptosis, necrosis e inflamación); sorprendentemente, aunque TNF y

p53 son inductores de la expresión de GDF15, el aumento renal de GDF15 in vivo no se evitó en ratones deficientes en TNF o p53 (67).

En humanos, los niveles séricos de GDF15 se encuentran elevados en la ERC, así como otras enfermedades inflamatorias crónicas. En un estudio con dos cohortes de pacientes independientes se observó que los niveles séricos de GDF15 se correlacionan con la expresión intrarrenal tubulointersticial de GDF15, lo que puede sugerir que parte del GDF15 circulante es de origen renal. Asimismo, en este estudio los niveles elevados de GDF15 se asocian significativamente con el aumento del riesgo de progresión de la ERC (68). En pacientes sometidos a cirugía de bypass cardiaco, los niveles elevados de GDF15 sérico predecían la incidencia de Fracaso renal agudo postoperatorio (69, 70).

En un estudio realizado en 2 cohortes de pacientes en hemodiálisis, suecos y americanos, 479 pacientes en total, los niveles séricos altos de GDF15 se asociaron con malnutrición y marcadores de estrés oxidativo e inflamación. Además, permitieron identificar pacientes con protein-energy wasting que fallecieron en los 3 primeros años de diálisis. Por lo tanto, GDF15 mostró ser un marcador independiente de mortalidad en ERC capaz de mejorar significativamente la predicción de mortalidad de otros marcadores establecidos (71).

En pacientes con nefropatía diabética niveles séricos más altos de GDF-15 predicen todas las causas de mortalidad y mortalidad-morbilidad cardiovascular, además de que se asocia a pérdida más rápida de la tasa de filtración glomerular (72). Medido en orina, el GDF15 estaba elevado en pacientes diabéticos tipo 2 con disminución en la tasa de filtración glomerular (<90ml/min) independiente de la microalbuminuria, edad, sexo, raza y uso de inhibidores de la enzima angiotensina y antagonistas del receptor de angiotensina. Además, GDF15 se asoció con aumento de la actividad de N-acetil- β -d- glucosaminidasa urinaria, un marcador de daño del túbulo proximal (73).

Dados estos hallazgos prometedores de GDF15 como predictor de daño renal, y que no existen datos en patologías glomerulares, queremos investigar si los niveles de GDF15 pueden actuar como biomarcadores de la enfermedad renal glomerular.

Hipótesis y Objetivos

Hipótesis

En un estudio transcriptómico de un modelo preclínico objetivamos que el gen de la familia de GDF más sobreexpresado fue GDF15. Hipotetizamos que GDF15 podría ser un marcador de daño renal en nefropatías experimentales y clínicas.

Objetivos

Objetivo General

Buscar nuevos biomarcadores de daño renal que permitan mejorar la capacidad del clínico para estratificar el riesgo de progresión o identificar las vías moleculares de daño renal activado.

Objetivos Específicos

1. Caracterizar la expresión de GDF15 en modelos de nefropatías experimentales.
2. Caracterizar la expresión de GDF15 en bases de datos de biología de sistemas.
3. Caracterizar el potencial de GDF15 sérico y urinario como biomarcador de hallazgos histológicos renales en pacientes con enfermedad renal crónica biopsiada o como marcador que ayude a estratificar el riesgo de progresión.

Materiales y Métodos

Este estudio se realizó en 3 partes, una primera parte experimental, una segunda parte data mining, y una tercera parte clínica con una cohorte de pacientes con biopsia renal (figura 10). En la **primera parte experimental** se estudiaron mediante transcriptómica los genes de la familia GDF, y se identificó el gen cuya expresión sufre mayor modificación en 3 modelos de daño renal: fracaso renal agudo, proteinuria e inflamación renal. Una vez identificado el GDF15 como el gen con mayor modificación en estos modelos, se confirmó la expresión diferencial mediante transcripción inversa y PCR a tiempo real (RT-PCR), prueba gold standard, en un modelo experimental de nefritis lúpica.

En la **segunda parte, data mining**, se realizó una búsqueda y análisis estadísticos de la base de datos Nephroseq (74). Nephroseq es un motor de búsqueda de investigación en el que se puede acceder y extraer datos de transcriptómica realizados previamente por otros investigadores, permite analizar la expresión de genes en riñones humanos y animales con enfermedades renales. En esta búsqueda se identificaron todos los estudios experimentales y en humanos en los que se había medido la expresión de GDF15 en tejido renal, glomérulo y túbulo-intersticio; y se analizaron y resumieron los resultados.

La **tercera parte, cohorte de pacientes con biopsia renal**, que podemos dividir en 3 apartados: en el primer apartado, analizamos mediante ELISA la expresión de **GDF15 en muestras de suero y orina** de pacientes que se sometieron a biopsia renal entre septiembre 2012 y marzo 2017, en el Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz, Madrid, España. Previa autorización de los pacientes mediante consentimiento informado, se recogieron muestras de sangre y orina antes de la biopsia, además de datos clínicos como: edad, diagnóstico de la biopsia, función renal, proteinuria y hematuria. Se determinó GDF15 en suero y correlacionaron los datos clínicos con los valores basales de GDF15. En el segundo apartado se correlacionaron los niveles de GDF15 con evolución clínica de pacientes y en un tercer apartado analizamos mediante inmunohistoquímica **muestras de tejido de biopsia renal**, en un total de 10 pacientes.

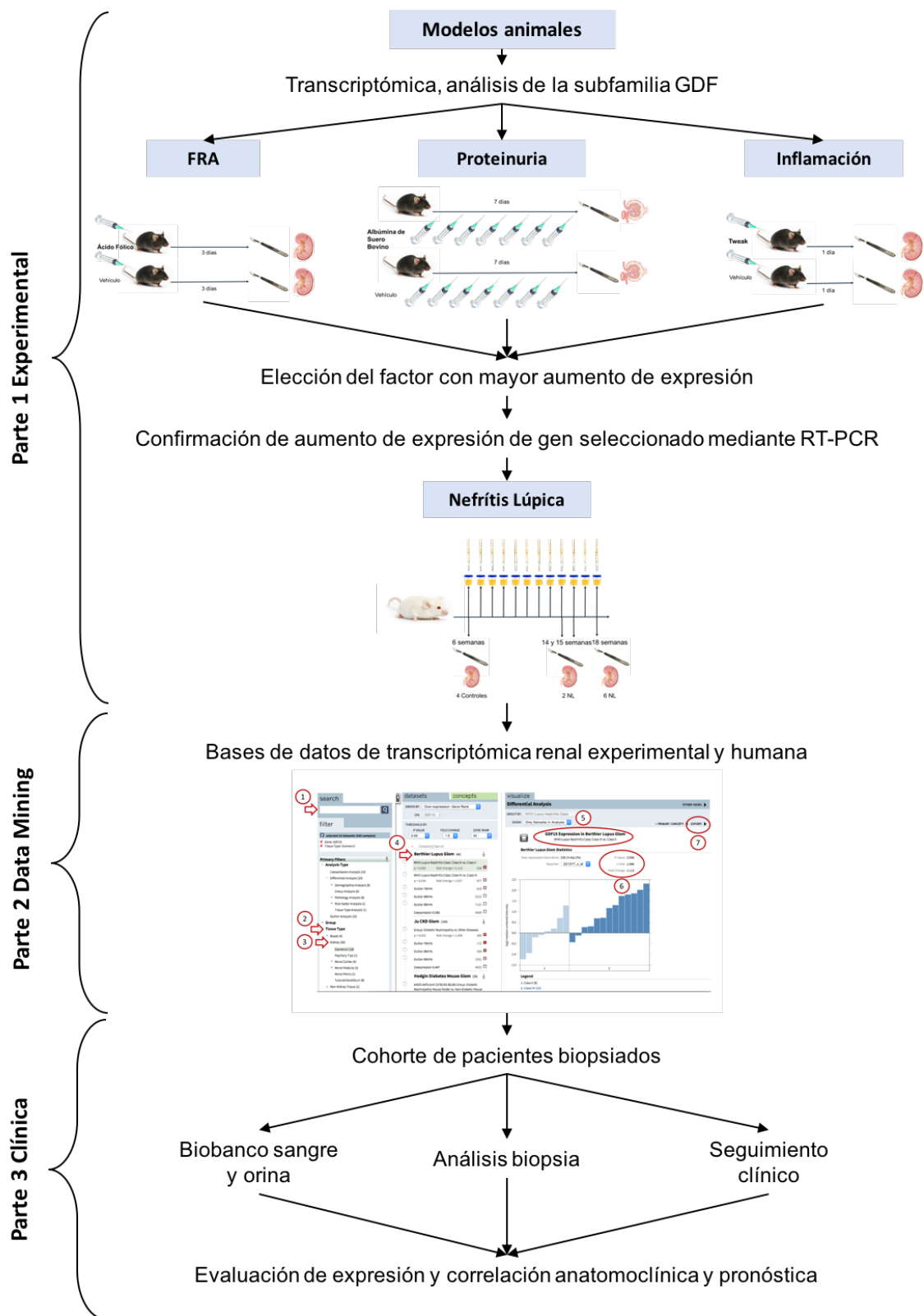


Figura 10 Visión general del estudio

1. Primera parte: experimental

La experimentación es parte del proceso científico y una de las formas en que aprendemos sobre el funcionamiento de sistemas. La finalidad de estos experimentos fue encontrar el gen de la familia GDF que sufre mayor modificación en sus niveles de expresión en diferentes formas de daño renal experimental, para luego confirmar los cambios de expresión en modelos humanos, en busca de un potencial biomarcador y/o diana terapéutica en el daño renal.

1.1. Modelos experimentales

Se estudiaron 4 modelos de daño renal en ratones. Un modelo de fracaso renal agudo, un modelo de daño renal por proteinuria, un modelo de respuesta renal a la inflamación sistémica y un modelo de nefritis lúpica.

1.1.1. Modelo de fracaso renal agudo

En este modelo se produce FRA mediante la administración exógena de ácido fólico, el FRA es consecuencia de la precipitación intratubular de ácido fólico, y se caracteriza por muerte y regeneración-proliferación de células tubulares, inflamación intersticial y aumento de fibrosis de leve intensidad. Los niveles séricos de urea y creatinina suben a las 24 horas, tienen un pico a los 3 días y bajan progresivamente hasta casi normalizarse a los 7 días. Se utilizaron 2 grupos de ratones “wild type” cepa C57BL/6, hembras de 12 semanas de edad. Se indujo fracaso renal agudo (n=3) mediante la inyección el día 0 de ácido fólico (Sigma, St Louis, MO, USA) a una concentración de 250 mg/kg resuspendida en una solución de bicarbonato 3M. Los controles (n=3) recibieron el vehículo. Se practicó eutanasia 3 días posteriores a la administración de ácido fólico (Figura 11) (75). Se realizó transcriptómica mediante técnica de Arrays en tejido renal.

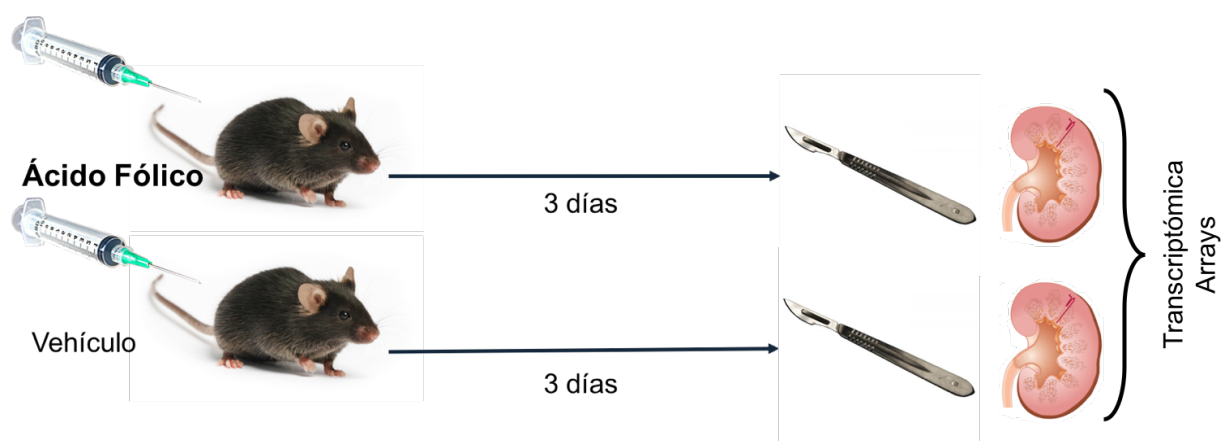


Figura 11 Diseño del modelo experimental: Fracaso Renal Agudo

1.1.2. Modelo de daño renal por proteinuria

En este modelo se administra albúmina de suero bobino en el peritoneo de ratones. Se produce albuminuria patológica tanto de la albúmina endógena como de la exógena. La albuminuria se produce como consecuencia de la albuminemia patológica y lesión secundaria del podocito. La albuminuria, a su vez, desencadena una respuesta inflamatoria fibrótica tubulointersticial. Se utilizaron 2 grupos de ratones “wild type” cepa C57BL/6, hembras de 12 semanas de edad. Se indujo albuminuria (n=3) mediante la inyección intraperitoneal diaria durante 7 días de albúmina de suero bovino (Sigma, St Louis, MO, USA) a una concentración de 0,2 mg resuspendida en suero salino 0,9%. Los controles (n=3) recibieron el vehículo. Se practicó eutanasia 7 días posteriores al inicio de la administración (Figura 12) (76). Se realizó transcriptómica mediante técnica RNA-seq en glomérulos renales.

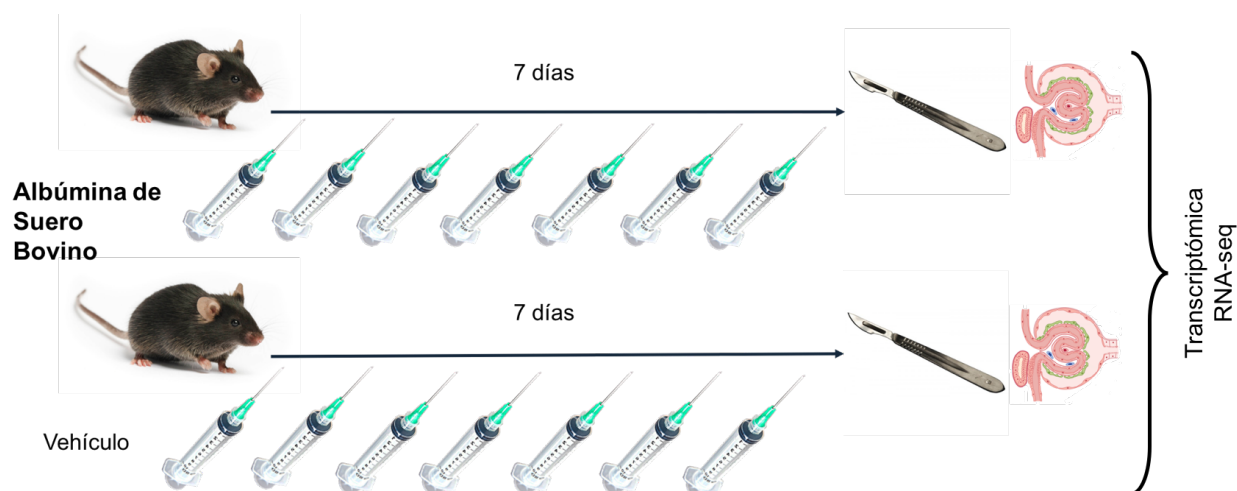


Figura 12 Diseño del modelo experimental: proteinuria

1.1.3. Modelo de respuesta renal a la inflamación sistémica

Se utilizaron 2 grupos de ratones “wild type” cepa C57BL/6, hembras de 12 semanas de edad. Se indujo inflamación (n=3) mediante la inyección de Tweak (Sigma, St Louis, MO, USA) a una concentración de 0,75 μg resuspendida en suero salino 0,9%. Esta dosis se estableció al extrapolar los estudios dosis respuesta en células cultivadas a un volumen de distribución estimado de 7,5 ml en ratones de 25 g. Dada la corta duración no hay una respuesta inmune frente a la albúmina exógena. Este modelo se caracteriza por una respuesta inflamatoria tubular con reclutamiento de leucocitos en el intersticio. Los controles (n=3) recibieron el vehículo. Se practicó eutanasia al siguiente día de la administración de Tweak (Figura 13) (77). Se realizó transcriptómica mediante técnica de RNA-seq en tejido renal.

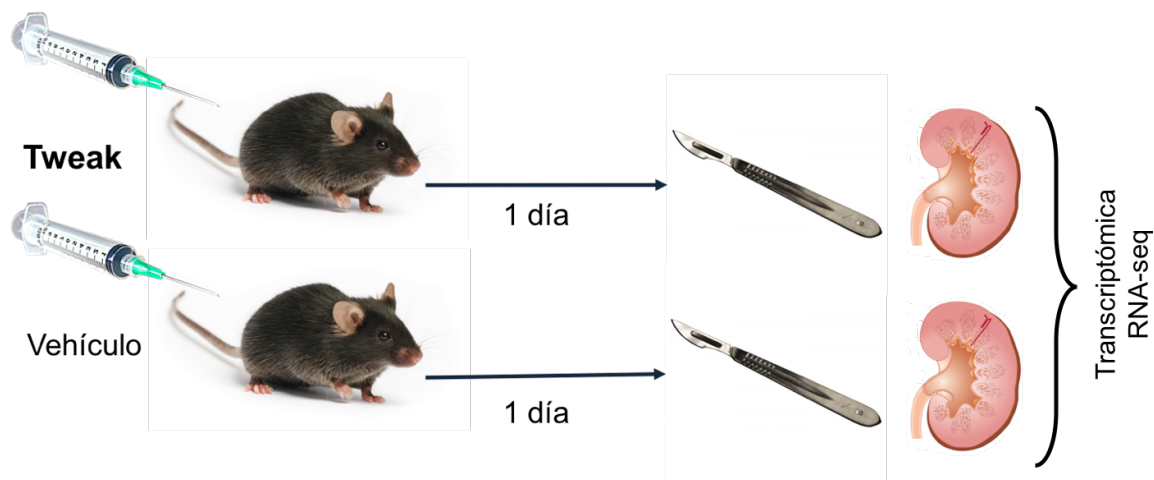


Figura 13 Diseño del modelo experimental: respuesta renal a la inflamación sistémica

1.1.4. Modelo de nefritis lúpica

Se utilizaron ratones MRL/lpr. Estos ratones tienen una mutación en el gen que codifica el receptor FAS, responsable de muerte celular programada de linfocitos autorreactivos, la carencia de FAS facilita la supervivencia de linfocitos autorreactivos y con el tiempo se desarrolla autoinmunidad con manifestaciones serológicas, histológicas y bioquímicas similares al lupus eritematoso sistémico (78). A nivel renal este modelo se caracteriza por el desarrollo de una glomerulonefritis por inmunocomplejos con proteinuria y hematuria de origen glomerular, eventualmente letal. Se inició el estudio con 12 animales, todas hembras de 6 semanas de edad, se hicieron determinaciones semanales de proteinuria mediante tiras reactivas (escala semicuantitativa de 1+ a 4+, donde los valores corresponden a 1=30mg/dl, 2=100mg/dl, 3=300mg/dl y 4=1000mg/dl). A 4 animales se les practicó eutanasia en la semana 6 (antes de desarrollar lesión renal) y se usaron como grupo control, al resto se les practicó la eutanasia cuando desarrollaban la nefritis lúpica, definida como proteinuria de 4+. A 2 de los animales se realizó en las semanas 14 y 15 por estar muy enfermos, incluso uno presentó hematuria, y al resto (n=6) en la semana 18 (Figura 14). Se realizó transcripción inversa y PCR a tiempo real (RTPCR) para cuantificación de GDF15 en tejido renal.

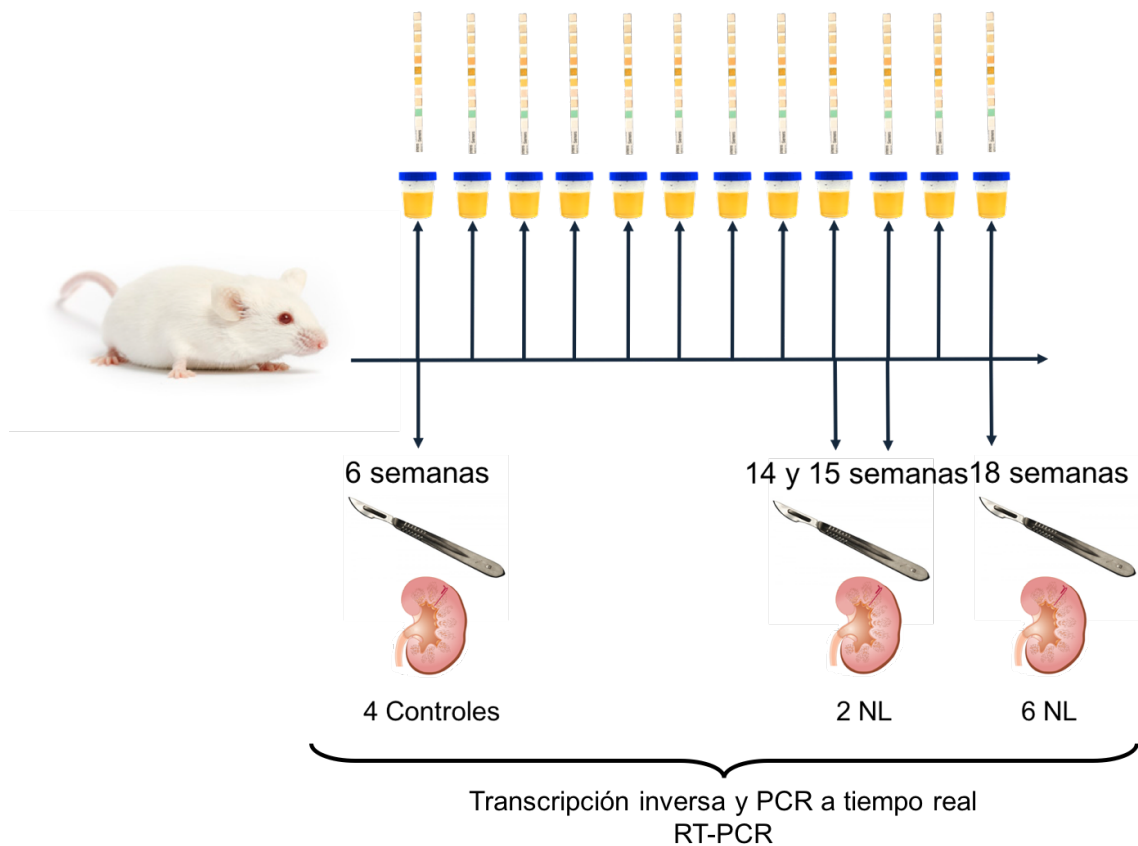


Figura 14 Diseño del modelo experimental: nefritis lúpica

1.2. Procesamiento de los tejidos

En el momento de la eutanasia, los animales fueron anestesiados con 5 mg/100 g de pentobarbital sódico. Se canuló la aorta abdominal a la altura de la bifurcación de las iliacas y tras abrir un orificio en la vena cava inferior y clampar la aorta a su entrada en el abdomen, se perfundieron los riñones con 50 mL de solución salina al 0,9% a 4°C. A continuación, se extrajeron los riñones, se decapsularon y se dividieron. Una parte se congeló en nitrógeno líquido para estudios de biología molecular y proteína. Para inmunohistoquímica, las muestras se sumergieron en paraformaldehído 4% en PBS para su posterior inclusión en parafina.

1.3.Extracción de ARN

El ARN se extrajo con dos métodos diferentes:

- Para transcriptómica mediante técnica de Arrays y RT-PCR: el ARN total de tejido se extrajo siguiendo las instrucciones de uso del reactivo Trizol [Invitrogen; Carlsbad, California (EEUU)]. La cuantificación del ARN se realizó por medida de la absorbancia de las muestras a 260 nm, teniendo en cuenta que 1 unidad de absorbancia corresponde a 40 g/ml de ARN. Se comprobó que la relación entre las absorbancias 260 y 280 nm era cercana a 2, indicando la ausencia de contaminación por proteínas (79).
- Para transcriptómica mediante RNA-seq: A partir de 1 µg de ARN total, la fracción PolyA + se purificó y se fragmentó al azar, se convirtió en cDNA de doble hebra y se procesó a través de subsiguientes tratamientos enzimáticos de “end-repair”, “dA-tailing” y “ligation”, para adaptarlo según el kit Illumina’s “TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation Part # 15031047 Rev. D”. Al resultante cDNA se le aplicó “Illumina flow cell” para la formación de clusters y se secuenció para 50 bases en un formato de lectura única (Illumina HiSeq 2000). Las lecturas se verificaron con FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) y se alinearon con el genoma del ratón (GRCm38 / mm10) con TopHat-2.0.1050, usando Bowtie 1.0.051 y Samtools 0.1.1952, permitiendo dos mismatches y cinco multihits. En cuanto el “transcripts assembly”, la estimación de abundancia y expresión diferencial se calcularon con Cufflinks 2.2.150, utilizando el conjunto de datos de anotación de genoma de ratón GRCm38 / mm10 del UCSC Genome Browser. Las transcripciones con valores de expresión de FPKM inferiores a 0,05 en ambas condiciones se consideraron no expresadas y se excluyeron de análisis adicionales. (80)

1.4. Transcriptómica por técnica de arrays

La técnica de transcriptómica es un método para estudiar los niveles de expresión génica, esto es los niveles de ARN de todo el genoma. La técnica de Arrays o Chips emplea unas sondas de ADN unidas a un soporte sólido en una disposición regular, a ellas se une ARN o ADN previamente marcado con una sustancia fluorescente. Tiene la ventaja de que se puede detectar en un único procesamiento miles de genes. En este estudio utilizamos esta técnica para estudiar la expresión de las citoquinas de la familia GDF mediante el nivel de ARNm en el modelo experimental de FRA. Los análisis transcriptómicos por técnica de Arrays de este estudio se realizaron en la Unidad genómica Moncloa, Fundación Parque Científico de Madrid, Madrid, España.

1.5. Transcriptómica por técnica de RNA-seq

“RNA sequencing” es una forma de hacer transcriptómica, también llamada secuenciación completa del transcriptoma. Utiliza tecnología de secuenciación de nueva generación, ofrece la ventaja de poder visualizar todo el transcriptoma, tanto el ARN transcrito (como en la técnica de Arrays, predeterminado en las sondas), como también ARN que no se transcribe. En este estudio se utilizó esta técnica para estudiar la expresión de las citoquinas de la familia GDF mediante el nivel de ARNm en los modelos experimentales de proteinuria e inflamación. Las muestras se enviaron a la Escuela Superior de Ingeniería Informática, Universidad de Vigo, Ourense, España.

1.6. Transcripción inversa y PCR a tiempo real

Este es el método “gold standard” para estudiar los niveles de ARNm. El ARN se somete a una transcripción reversa de reacción de cadena de polimerasa “RT-PCR” por sus siglas en inglés “reverse transcription-polymerase chain reaction”. En este estudio se realizó RT-PCR en el tejido renal para determinar la cantidad de ARNm de GDF15 en el modelo de nefritis lúpica. La transcripción inversa se realizó con un µg de ARN

utilizando el High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems; Foster City, CA, EEUU).

La PCR a tiempo real se realizó mediante el sistema de detección secuencial Taiman ABI 7700 usando una TaqDNA polimerasa activada por temperatura (Amplitaq Gold). Después de un periodo inicial de 2 minutos a 50°C y de 10 minutos 95°C, las muestras pasaron por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C. Se realizó la amplificación del RNA de la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), en paralelo junto con el gen de interés, para utilizarlo como control interno. Los resultados de la amplificación del gen de interés se normalizaron con los datos obtenidos de los transcritos control. Tanto los cebadores como el resto de reactivos se obtuvieron de Applied Biosystems. Todas las medidas se realizaron por duplicado.

1.7. Análisis estadístico de datos experimentales

Las unidades de GDF15 se determinan como UA, que significa unidades arbitrarias. Los valores de GDF se expresan en media \pm error estándar de la media (eem). El Error estándar de la media es igual a la desviación estándar entre la raíz cuadrada de la muestra ($eem = \sigma/\sqrt{n}$).

En el modelo de FRA en el que se utilizó transcriptómica mediante técnica de arrays la significación estadística fue aportada por la unidad genómica Moncloa, Fundación Parque Científico de Madrid, Madrid, España. Se realizó en un primer momento un análisis robusto mediante el software Affymetrix Expression Console, y posteriormente el análisis de significación de microarrays se realizó utilizando el paquete limma (Babelomics, <http://www.babelomics.org>). Se utilizó un valor de p ajustado (fold discovery rate o FDR) para identificar los genes que fueron significativamente modificados entre los grupos analizados. Se considera significativo cuando $FDR < 0,05$.

En los modelos de proteinuria e inflamación, donde se utilizó la técnica de transcriptómica RNA-seq, la significación estadística se realizó usando el software

nextpresso (<http://bioinfo.cnio.es/nextpresso/>). Los mRNAs con valores de expresión de FPKM menores de 0,05 se consideraron como no expresados y se excluyeron de los análisis posteriores.

En el modelo de nefritis lúpica, en el que se realizó RT-PCR, la significación estadística se estableció mediante comparaciones de medias y test estadísticos no paramétricos (Wilcoxon), además se hizo correlación de Pearson para determinar la relación entre valor de GDF15 y proteinuria. Se utilizó XLSTAT, un software estadístico para Microsoft Excel.

2. Segunda parte: data mining

El data mining se realizó en bases de datos transcriptómicas de tejido renal, orientándose a la expresión de GDF15, ya que este fue el gen de la subfamilia GDF con mayor expresión en la transcriptómica de daño renal experimental.

2.1. Acceso y búsqueda de datos en Nephroseq

El motor de búsqueda Nephroseq está dirigido por el Profesor Matthias Kretzler, un nefrólogo y médico internista de la Universidad de Michigan, quien a través de invitaciones otorga acceso a la base de datos a investigadores interesados. Se nos ha otorgado un usuario y contraseña a través del Profesor Alberto Ortiz, tutor de este trabajo, y hemos accedido los días comprendidos entre 19 de enero 2017 y 14 de febrero 2017 (74).

El acceso se realizó a través de la página web: <https://www.nephroseq.org>; la búsqueda se realizó en el siguiente orden: (figura 15)

1. Se introdujo “GDF15” en la caja de búsqueda principal localizada en la esquina superior izquierda.
2. Se aplicó el filtro “tipo de tejido” (Tissue Type).
3. Se aplicó el filtro “riñón” (Kidney).

4. Se exploraron cada uno de los estudios en los que se realizó transcriptómica en tejido renal y se había determinado ARNm de GDF15, se clasificaron los estudios por
 - 4.1. Estudios en humanos o experimentales.
 - 4.2. Tipo de patología glomerular.
 - 4.3. Tipo de tejido estudiado: Renal, Glomérulo o Túbulointersticio.
5. Se revisaron las comparaciones hechas de forma automática en el programa, seleccionando especialmente las comparaciones entre patologías glomerulares y “riñón normal”. La definición de “riñón normal” podía variar en cada estudio, pudiendo ser: nefropatía de cambios mínimos, riñones procedentes de donantes vivos o riñones con tumores renales, de una parte alejada del tumor.
6. Análisis de significación estadística de las comparaciones, siendo determinada la significación estadística por $p < 0,05$, y valoración del ratio de cambio GDF15 en patología vs control.
7. En algunos casos, en los que el programa no ofrecía comparaciones que nos parecían de interés, exportamos los datos y realizamos las comparaciones de media, ratio y significaciones estadísticas de forma manual.

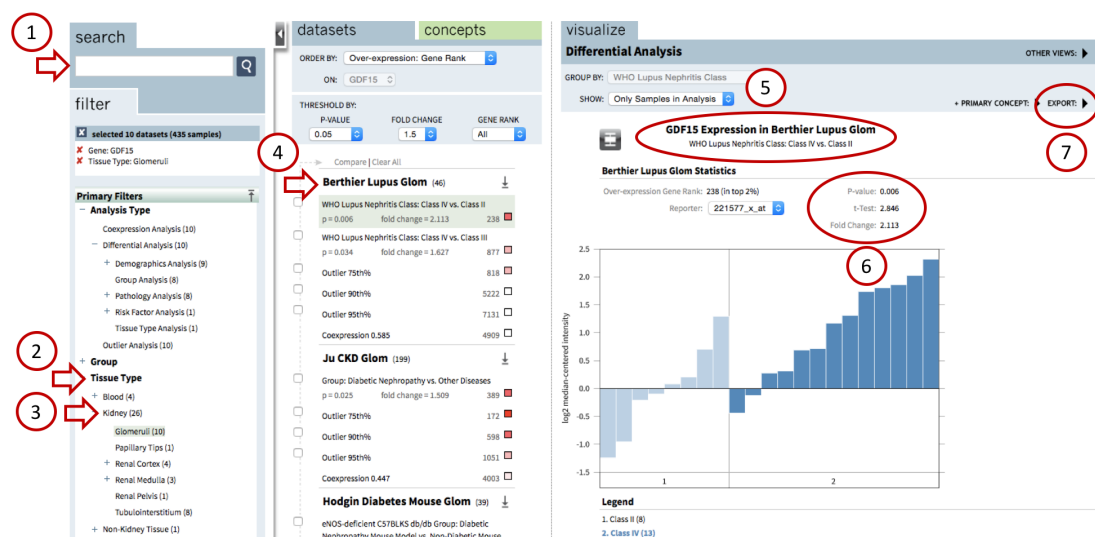


Figura 15 Orden de realización de la búsqueda en Nephroseq

2.2. Análisis estadístico de data mining

En la mayoría de las comparaciones el programa Nephroseq aportó los valores de p y ratio de cambio (fold change), en los casos en los que se determinaron de forma manual, se exportaron los datos y se calcularon las medias, la significación estadística se estableció mediante comparaciones de medias y test estadísticos no paramétricos (Wilcoxon). Se utilizó XLSTAT, un software estadístico para Microsoft Excel.

3. Tercera parte: cohorte de pacientes con biopsia renal

3.1. Aspectos éticos

El protocolo fue aprobado por el comité ético de investigación clínica del Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz y se ajustó a la normativa española y europea.

3.2. Selección de pacientes

Se incluyeron todos ($n = 84$) los pacientes consecutivos que se sometieron a biopsia renal y que firmaron consentimiento informado entre los meses septiembre 2012 y marzo 2017, en el Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz, Madrid, España. Fueron excluidos pacientes con serología positiva para virus hepatitis C, virus hepatitis B y virus de Inmunodeficiencia Humana (por riesgo al manipular las muestras en el laboratorio) y aquellos que no firmaron consentimiento informado. Se recogieron muestras de sangre y orina de los pacientes, y se recogieron también muestras de biopsia renal procesadas en parafina.

3.3.Recolección y procesamiento de muestras

3.3.1. Muestras de sangre y orina

El día del ingreso del paciente para la biopsia renal, se explicaba el estudio, se firmaba el consentimiento informado para preservar muestras biológicas en el biobanco de la Fundación Jiménez Díaz, y al momento de coger la vía intravenosa para administración de antibiótico profiláctico del paciente, antes de la administración del antibiótico se extraían muestras de sangre (tubo de suero 10 ml y tubo de plasma 10 ml) y además le pedía una muestra de orina. Las muestras de plasma, suero y orina, se llevaban al laboratorio donde eran centrifugadas y almacenadas en congelador de -80°. En estas muestras se realizó ELISA para cuantificación de GDF15 y en las de orina se cuantificó creatinina.

3.3.2. Muestras de biopsia renal

La muestra de biopsia renal se llevaba al laboratorio de anatomía patológica y se procesaba y analizaba según procedimiento habitual, es decir las muestras no se manipulaban de forma diferente por el hecho de participar en el estudio. El consentimiento otorgado por el paciente permitía usar para la investigación la porción de la muestra que no hubiese sido usada para fines diagnósticos. El o los cilindros renales fueron divididos en una porción con glomérulos para congelación, otro para procesamiento para microscopía electrónica, el resto incluido en parafina. De forma rutinaria estos últimos se tiñen con hematoxilina-eosina, PAS, masson, además de otras tinciones en función de los hallazgos histológicos y diagnóstico de sospecha. Además, existe un número de cortes que, aunque se procesen en parafina no se tiñen de forma rutinaria a menos que se necesite repetir alguna tinción o estudiar más tejido. En ocasiones estos cortes no se utilizan y se guardan. Estas muestras de parafina no teñidas guardadas (n = 32), seleccionamos 10 paciente, 5 de los cuales con GDF15 urinario alto y 5 con GDF15 urinario bajo, y se tiñeron con inmunohistoquímica.

3.4.Recolección de datos clínicos y analíticos de los pacientes

Se recogieron en una hoja de Microsoft Excel los siguientes datos de los pacientes:

- Edad al momento de la biopsia
- Género
- Síndrome Clínico
- Antecedentes de HTA o DM
- Datos del informe de la biopsia renal:
 - Diagnóstico, para la clasificación de los diagnósticos creamos 2 grupos:
 - Grandes categorías: agrupamos los diagnósticos de los pacientes en 8 grandes categorías:
 - Glomerulonefritis inflamatorias primarias o secundarias: en este grupo incluimos patologías glomerulares con claro componente inflamatorio, como se ha explicado en el apartado de patogenia de las glomerulonefritis, entre las que tenían nuestros pacientes incluimos en este grupo: NlgA, nefritis lúpica, vasculitis, glomerulopatía C3, glomerulonefritis endocapilar, vasculopatía con microangiopatía trombótica y glomerulonefritis extracapilar.
 - Glomerulonefritis no inflamatorias primarias o secundarias, en este grupo incluimos: glomerulonefritis 0 de cambios mínimos, GSFS, glomerulonefritis membranosa, glomerulonefritis mesangial IgM, amiloidosis (excepto uno con componente extracapilar incluido en el grupo de inflamatorias), nefroangiosclerosis y nefropatía diabética.
 - Nefropatía tubulointersticial crónica
 - Necrosis tubular aguda aislada
 - ERC avanzada sin causa evidente

- Rechazo de trasplante
- Trasplante, otra
- Otra
- Diagnósticos específicos agrupamos en 16 categorías específicas:
 - GSFS
 - NlgA
 - Nefropatía membranosa
 - Nefropatía de cambios mínimos
 - Nefropatía diabética
 - Nefroangiosclerosis
 - Glomerulonefritis mesangial IgM
 - Nefropatía por depósito: incluye mieloma múltiple, nefropatía por depósito IgG kappa y amiloidosis tanto primaria como secundaria.
 - Nefritis lúpica II o V
 - Nefritis lúpica III o IV. (hemos querido separar las clases de nefritis lúpica más inflamatorias de las menos inflamatorias)
 - Vasculitis
 - Necrosis tubular aguda
 - Nefritis tubulointersticial crónica
 - Rechazo en trasplante renal
 - Trasplante renal, otros diagnósticos
 - Otros
- Numero de glomérulos en la biopsia
- Datos de actividad, porcentaje de actividad y tipo de lesión activa, llamamos lesiones de actividad: hiper celularidad endocapilar, necrosis fibrinoide, proliferación extracapilar, cariorexis, depósitos mesangiales, subendoteliales y subepiteliales, dobles contornos o spikes de la membrana basal glomerular.

- Datos de cronicidad, porcentaje de glomérulos esclerosados, porcentaje de atrofia, porcentaje de fibrosis intersticial y coexistencia de GSFS.
- Presencia de semilunas, porcentaje y tipo (celulares, fibrocelulares o fibrosas)
- Otra patología que justifique aumento de GDF15 al momento de la biopsia: Cáncer, enfermedad sistémica activa u otro.
- Datos analíticos basales (al momento de la biopsia):
 - Creatinina plasmática (mg/dl)
 - FGe cuantificado por la formula MDRD4. Hemos escogido esta fórmula ya que es más precisa en filtrados glomerulares $<60 \text{ ml/min/1.73 m}^2$ (81), que corresponde a la mayoría de nuestros pacientes. A su vez clasificamos a los pacientes en función del FGe de G1 a G5, según las guías KDIGO:
 - G1: FGe $>90 \text{ ml/min/1.73 m}^2$
 - G2: FGe $60\text{-}89 \text{ ml/min/1.73 m}^2$
 - G3: FGe $30\text{--}59 \text{ ml/min/1.73 m}^2$
 - G4: FGe $15\text{--}29 \text{ ml/min/1.73 m}^2$
 - G5: FGe $<15 \text{ ml/min/1.73 m}^2$
 - Hemoglobina (g/dl)
 - Albúmina (g/dl)
 - Colesterol total (mg/dl)
 - Fósforo (mg/dl)
 - Glucemia (mg/dl)
 - Títulos de ANA
 - Títulos de antiDNA
 - Títulos de ANCA
 - Títulos de ANCA MPO
 - Títulos de ANCA PR3
 - Títulos de AMBG
 - IgA (mg/dl)
 - Complemento C3 y C4 (mg/dl)

- Existencia de paraproteína por inmunoelectroforésis en sangre kappa o lambda (si/no)
- Sistemático de orina: proteinuria en mg/dl, y en sedimento: leucocituria (leucocitos/campo) y hematuria (hematíes/campo). La cuantificación de hematíes y leucocitos en sedimento de orina se realiza en escala 0, 0-5, 5-10, 10-20 y >20. A lo que asignamos los siguientes valores:
 - 0= 0
 - 0 - 5= 2,5
 - 5 – 10= 5
 - 10 – 20= 10
 - >20= 25
- Cociente MAU/Cr (mg/g), clasificamos a los pacientes en función de albuminuria de A1 a A3, según guías KDIGO:
 - A1: <30 mg/g
 - A2: 30 – 299 mg/g
 - A3: >300 mg/g
- Estado actual del paciente en marzo 2017
 - Vivo
 - En terapia sustitutiva de la función renal iniciada después de la biopsia
 - Fallecido
 - Desconocido
- Últimos datos analíticos conocidos del paciente, si está en hemodiálisis o fallecido, últimos datos analíticos antes de estos eventos:
 - Creatinina plasmática (mg/dl)
 - FG estimado MDRD4 (ml/min/1.73 m²)
 - Cociente MAU/Cr (mg/g)
 - Pendiente de pérdida de FG, calculado mediante la fórmula:

$$\frac{FG\ final - FG\ basal}{meses\ de\ seguimiento}$$
 - Pendiente de aumento de MAU, calculado mediante la fórmula:

$$\frac{MAU\ final - MAU\ basal}{meses\ de\ seguimiento}$$

3.5. Controles

Recogimos muestras de sangre en 8 controles sanos y de orina en 7 controles sanos para realizar comparación de niveles de GDF15 con nuestros pacientes. Las muestras fueron procesadas de la misma forma que la de los pacientes. La determinación de GDF15 se hizo mediante ELISA.

3.6. ELISA

ELISA, de las siglas en inglés “enzyme-linked immunosorbent assay”, es un método frecuentemente usado para medir las concentraciones de proteínas en fluidos biológicos. El ELISA emplea anticuerpos para detectar proteínas específicas. En este estudio se midió la concentración de GDF15 mediante ELISA en las muestras de suero y orina de pacientes en los que se realizó biopsia renal. La concentración de GDF15 se determinaron en 50 µl de suero y 10 µl de orina por duplicado mediante un ELISA disponible comercialmente (Quantikine Human GDF-15, R&D Systems, Minneapolis). Los valores se expresaron en pg/mL en suero y como pg/mg de creatinina en orina. Cada ensayo se calibró utilizando una curva estándar con concentraciones conocidas de GDF15.

3.7. Inmunohistoquímica

La Inmunohistoquímica se usa para localizar proteínas en los tejidos. Se usan anticuerpos primarios que se unen específicamente a las proteínas de interés, y anticuerpos secundarios marcados con una enzima, que se unen a los anticuerpos primarios y tras una reacción química permiten la localización de proteínas de interés mediante el uso del microscopio. En este estudio se hizo Inmunohistoquímica en biopsias renales para determinar la expresión celular de GDF15.

Se utilizaron secciones de 5 µm de tejido incluido en parafina que se montaron sobre portaobjetos pre tratados con APES al 2% en acetona. Una vez des parafinadas y rehidratadas en concentraciones decrecientes de etanol, las secciones se incubaron durante 30 minutos en 3% H₂O₂: metanol (1:1) para bloquear la peroxidasa endógena. Tras lavar en PBS se incubaron 1 hora en 6% de suero de conejo, 4% albúmina sérica bovina (BSA) en PBS. A continuación, se incubó durante 18 h a 4°C con el anticuerpo anti GDF15 (R&D Systems), disuelto a 1:100 en 1% suero, 4% BSA en PBS. Tras la incubación con el anticuerpo primario se lavaron en PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con biotina (1/200, Amersham), disuelto en 4% BSA-PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Las muestras incubadas con anticuerpo secundario conjugado con biotina, se trataron con el complejo ABC-HRPO (DAKO, Glostrup, Dinamarca) durante 30 min a 37°C. La localización del anticuerpo se determinó mediante la adición del cromógeno DAB (Dako): 3% H₂O₂ (130:1) durante 10-15 min. Por último, se aplicó a las secciones una tinción de fondo con hematoxilina de Carazzi (Bio-Optica, Milán, Italia), se deshidrataron y montaron en DPX (BDH, Poole, Inglaterra). Los controles negativos se incubaron sin anticuerpo primario o con una inmunoglobulina control.

3.8. Análisis estadístico de los datos de pacientes

Los valores de GDF15 en suero se expresaron en ng/ml y de GDF15 en orina en ng/mg de creatinina, se calculó el aclaramiento de GDF15 mediante la fórmula: $CGDF15 =$

$$\frac{(GDF15_{orina} \text{ ng/mg} * 1000)}{GDF15_{suero} \text{ ng/ml}} \cdot \frac{1440}{1440}$$

El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa SPSS 22.0 para Windows. Los métodos estadísticos utilizados fueron los siguientes (82):

- Estadística descriptiva de las variables cuantitativas (procedimiento DESCRIPTIVE y EXPLORE) para la descripción de las muestras: media, desviación estándar, máximo, mínimo, mediana, desviación estándar de la media, y test de normalidad de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk, etc (83).

- Tablas de contingencia para la relación entre variables cualitativas (procedimiento CROSSTABS). Test Exacto de Fisher o Prueba de Chi-cuadrado para contrastar la independencia o influencia entre dos variables cualitativas, con información en cada casilla de la tabla de contingencia del porcentaje en fila y los residuos corregidos no tipificados para ayudar a descubrir las tramas en los datos que contribuyen a una influencia significativa (83, 84).
- Relación bivalente entre variables continuas (procedimiento CORR), con la obtención del coeficiente de correlación de Pearson (83).
- Test no paramétrico de Mann-Whitney (procedimiento NPTESTS) para la comparación de una variables cuantitativa entre dos grupos (83).
- Test no paramétrico de Kruskal-Wallis (procedimiento NPTESTS) para la comparación de una variables cuantitativas entre más de dos grupos y la comparación post-hoc de Bonferroni (83).
- Curvas ROC (procedimiento ROC) para representar gráficamente la sensibilidad frente a (1 – especificidad) en un sistema clasificador binario según se varía el umbral de discriminación, es decir muestra la representación de la razón o ratio de verdaderos positivos (VPR = Razón de Verdaderos Positivos) frente a la razón o ratio de falsos positivos (FPR = Razón de Falsos Positivos) también según se varía el umbral de discriminación (valor a partir del cual decidimos que un caso es un positivo). Se obtiene el área bajo la curva (AUC) que da un índice de calidad del diagnóstico, De [0.5, 0.6): Test malo. [0.6, 0.75): Test regular. [0.75, 0.9): Test bueno. [0.9, 0.97): Test muy bueno. [0.97, 1): Test excelente. Para decidir un punto de corte se puede ayudar con el índice de Youden, para ver punto de corte, aquel valor que maximice la diferencia entre sensibilidad y (1 – especificidad) (83).
- Árboles de decisión (procedimiento TREE), gráficos que ilustran reglas de decisión de forma que parten de un nodo raíz que contiene todas las observaciones de la muestra y a medida que se desplaza por el árbol, los datos se ramifican en subconjuntos de datos que se excluyen mutuamente.

Se realiza para segmentar, estratificar, predecir e identificar interacciones de variables en la muestra (82).

- Análisis de regresión lineal (procedimiento REGRESSION) para la relación de variables cuantitativas y dicotómicas, de forma que unas, variables independientes o predictivas, predigan los valores de la otra, estimando los coeficientes de una ecuación lineal (83).
- Análisis de regresión logística (procedimiento LOGISTIC REGRESSION) es un tipo de análisis de regresión utilizado para predecir el resultado de una variable categórica (una variable que puede adoptar un número limitado de categorías) en función de las variables independientes o predictoras. Es útil para modelar la probabilidad de un evento ocurriendo como función de otros factores (83).

En relación al estudio de muestras de biopsia renal teñidas con inmunohistoquímica para GDF15 se cuantificó el porcentaje de muestra teñida con un sistema de puntuación cuantitativa, el software Image-Pro Plus (Media Cybernetics, Bethesda, MD) en 10 campos seleccionados al azar (x20) por cada muestra. Las muestras se examinaron de una manera cegada. Se valoró la diferencia de medias y la significancia estadística mediante test no paramétrico (Wilcoxon). Se utilizó el software estadístico SPSS

Resultados

1. Primera parte: experimental

1.1. Modelo de fracaso renal agudo

El primer estudio experimental se hizo en ratones con FRA por precipitación intratubular de ácido fólico a los que se les inyectó ácido fólico (figura 11) (75). En este modelo estudiamos la expresión de todos los genes de la familia GDF a las 72 horas de inducción del FRA y los comparamos con ratones controles, con el objeto de valorar cuál de estos genes presenta mayor modificación. Para estudio de expresión de ARNm se realizó transcriptómica mediante técnica de Arrays. Como se puede apreciar en la tabla 6, los genes que se modifican de forma significativa son el GDF15 y el GDF3. De estos, el GDF15 es el gen que sufre mayor modificación, estando 3,28 veces más aumentado en los ratones con FRA vs grupo control (figura 16).

Tabla 6 Expresión de ARNm de genes de la familia GDF en el fracaso renal agudo experimental, analizado por transcriptómica, técnica de Arrays. Datos expresados como media \pm error estándar de la media.

Gen	FRA (UA)	Control (UA)	Ratio FRA/Control	Valor de p	Valor de p ajustado (FDR)
Gdf15	281,89 \pm 63,79	85,94 \pm 5,25	3,28	0,0006	0,0149
Gdf3	46,23 \pm 2,12	35,67 \pm 0,57	1,30	0,0032	0,0346
Gdf11	105,80 \pm 5,54	88,53 \pm 0,97	1,20	0,0235	0,1162
Gdf6	26,71 \pm 2,20	23,59 \pm 0,19	1,13	0,1792	0,4364
Gdf5	24,36 \pm 1,53	21,84 \pm 0,23	1,12	0,1588	0,4049
Gdf2	26,34 \pm 1,66	25,21 \pm 1,49	1,04	ns	ns
Gdf9	30,44 \pm 1,69	29,53 \pm 1,87	1,03	ns	ns
Gdf1	57,95 \pm 5,92	56,47 \pm 3,22	1,03	ns	ns
Gdf10	165,12 \pm 25,36	182,70 \pm 18,85	0,90	ns	ns
Gdf7	94,76 \pm 9,31	110,05 \pm 3,27	0,86	ns	ns

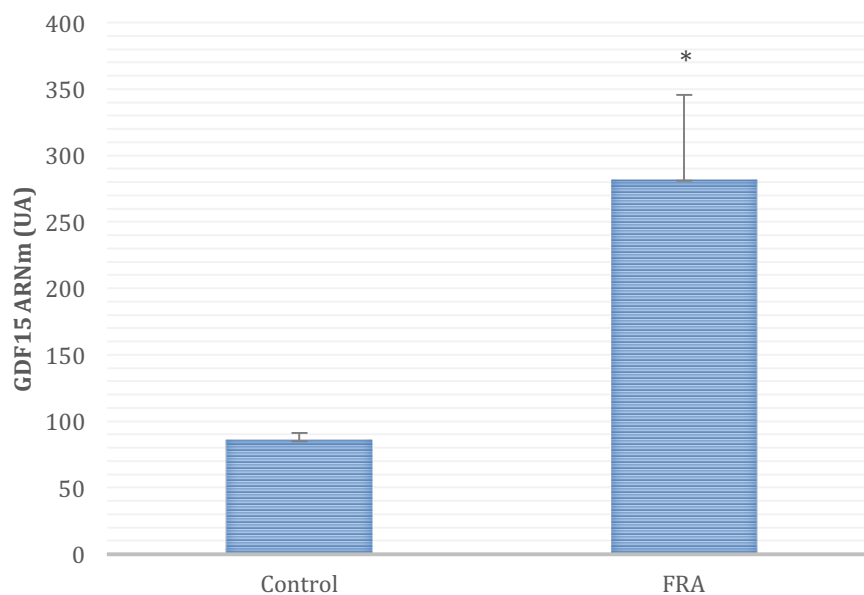


Figura 16 Expresión de GDF15 en control vs FRA. Datos Expresados Como Media \pm Error Estándar de la Media.

**FDR= 0,0149*

1.2. Modelo de daño renal por proteinuria

Ante el hallazgo anterior, nos planteamos si el aumento de GDF15 es exclusivo del FRA, o puede observarse en otras patologías renales, y nos centramos en la patología glomerular no inmune. Para ello hemos realizado un modelo experimental en el que se induce proteinuria en ratones, mediante administración intraperitoneal a corto plazo de albúmina sérica bovina (figura 12) (77). Además, en este modelo hemos obtenido muestras de glomérulo ya que la proteinuria indica lesión glomerular y para diferenciar del modelo anterior en el que hemos analizado muestras de riñón entero. Para el estudio de la expresión de ARNm se realizó transcriptómica mediante RNA-seq. Se confirma que el GDF15 es el gen que sufre mayor modificación también en la patología glomerular, siendo la expresión 1,17 veces mayor en los glomérulos de ratones con proteinuria en comparación con controles, y este cambio es estadísticamente significativo (tabla 7).

Tabla 7 Expresión de ARNm de genes de la familia GDF en el modelo de daño renal por proteinuria, Analizado por Transcriptómica, técnica de RNA-seq

Gen	Ratio BSA/Control	Valor de p
Gdf15	1,17	0,0302
Gdf1	1,08	0,21
Gdf3	1,05	0,0078
Gdf11	1,00	0,95
Gdf5	1,00	1,00
Gdf9	-1,01	0,59
Gdf2	-1,02	0,53
Gdf10	-1,29	0,038

1.3. Modelo de respuesta renal a la inflamación sistémica

En los modelos previos, FRA y Proteinuria, el gen de la familia GDF que más aumenta es el GDF15. Nos preguntamos si TWEAK, una citoquina que se ha demostrado que contribuye a FRA y al daño glomerular en el modelo proteinuria causado por sobrecarga de albúmina (76), es el responsable del aumento de GDF15. Exploramos el comportamiento de GDF15 en un modelo en el que se induce inflamación renal mediante la inyección intraperitoneal de una única dosis de TWEAK (figura 13) (77). En este modelo los genes que más se expresan en el riñón son GDF10, GDF11 y GDF15; y de estos el único gen que cambia significativamente su expresión, usando el criterio FDR, es el GDF15 que baja. (tabla 8 y figura 17). Estos datos sugieren que TWEAK no es el responsable del aumento de expresión de GDF15 durante el daño renal.

Tabla 8 Expresión de ARNm de genes de la familia GDF en inflamación, analizado por transcriptómica, técnica RNA-seq. Datos expresados como media \pm error estándar de la media

Gen	Control (UA)	Tweak (UA)	Ratio Tweak/Control	Valor de p	Valor de p ajustado (FDR)
Gdf15	64,97 \pm 10,84	39,87 \pm 2,83	0,614	0,0003	0,026
Gdf10	117,17 \pm 4,66	156,82 \pm 27,79	1,338	0,0247	0,42
Gdf11	26,89 \pm 6,19	30,31 \pm 1,89	1,127	ns	ns
Gdf3	7,91 \pm 0,57	5,79 \pm 0,63	0,733	ns	ns
Gdf7	3,35 \pm 1,77	6,91 \pm 1,91	2,065	ns	ns
Gdf1	2,12 \pm 0,45	3,76 \pm 1,21	1,774	ns	ns
Gdf9	2,07 \pm 0,59	2,57 \pm 0,32	1,238	ns	ns
Gdf5	2,04 \pm 0,56	2,03 \pm 1,16	0,996	ns	ns
Gdf6	1,03 \pm 0,03	1,58 \pm 0,88	1,525	ns	ns
Gdf2	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,000	ns	ns

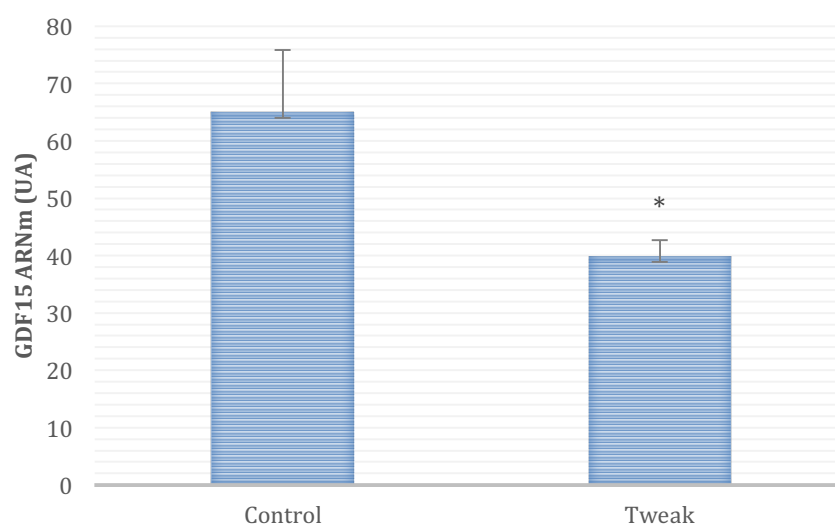


Figura 17 Expresión de GDF15 en control vs Tweak. Datos expresados como media \pm error estándar de la media.

** FDR = 0,026*

1.4. Modelo de nefritis lúpica

En los modelos previos hemos comprobado que la expresión de GDF15 esta aumentada en el riñón entero en el FRA y en los glomérulos en el modelo de proteinuria, donde es el gen de la familia GDF que más se modifica y aumenta su expresión, y hemos observado que TWEAK no parece el responsable de este aumento, ya que GDF15 renal disminuye de forma significativa al administrar TWAEK de forma sistémica. Estas determinaciones se han hecho mediante estudio de expresión de ARNm mediante transcriptómica (Arrays en el modelo de FRA y RNA-seq en los modelos de Proteinuria e inflamación con TWEAK), pero la transcriptómica es una técnica de despistaje. Quisimos confirmar la modificación de la expresión de GDF15 con la prueba “gold standard” recomendada para medir la expresión de ARNm, que es RT-PCR.

Escogimos un modelo de daño glomerular e intersticial de causa inmune, nefritis lúpica. Usamos 12 ratones hembras MRL/lpr. Como controles se tomaron 4 ratones de 6 semanas (que todavía no habían desarrollado nefritis lúpica). El otro grupo de ratones se siguió mediante monitorización de la proteinuria y fueron sacrificados cuando se objetivó evidencia de nefritis lúpica (figura 14) (78).

Se usó una escala semicuantitativa para medir la proteinuria, usando tiras reactivas (de 1+ a 4+) y sumamos los días en los que los ratones presentaban proteinuria de 2+, 3+ y 4+ respectivamente. 5 ratones acabaron el estudio con proteinuria máxima (de 4+), dos de ellos se sacrificaron antes de las 18 semanas por estar muy enfermos (uno de ellos incluso presentó hematuria) (tabla 9).

Los ratones con nefritis lúpica presentaban la expresión de ARNm de GDF15 siete veces más elevada que los ratones control, siendo la media de ratones con nefritis lúpica 112 ± 32 UA, y la media de ratones control 16 ± 4 UA ($p = 0,034$) (figura 18).

Tabla 9 Expresión GDF15 ARNm (UA) en el riñón completo de ratones MRL/lpr 6 semanas (control) vs ratones MRL/lpr 14-18 semanas (nefritis lúpica). Datos expresados como media \pm error estándar de la media.

NL: nefritis lúpica

	GDF15 ARNm (UA)	Edad de muerte (semanas)	Proteinuria*	Días con proteinuria 4	Días con proteinuria 3 y 4	Días con proteinuria 2, 3 y 4
Control 1	22,17	6	1	0	0	0
Control 2	12,24	6	1	0	0	0
Control 3	6,05	6	1	0	0	0
Control 4	23,58	6	1	0	0	0
NL 1	8,84	14	4	2	2	2
NL 2	259,50	15,5	4	7	10	10
NL 3	38,13	18	3	0	3	10
NL 4	51,00	18	2	0	0	10
NL 5	84,92	18	3	0	13	27
NL 6	93,52	18	4	15	15	19
NL 7	123,19	18	4	7	30	30
NL 8	237,47	18	4	16	16	20

*Escala semicuantitativa de 1+ a 4+

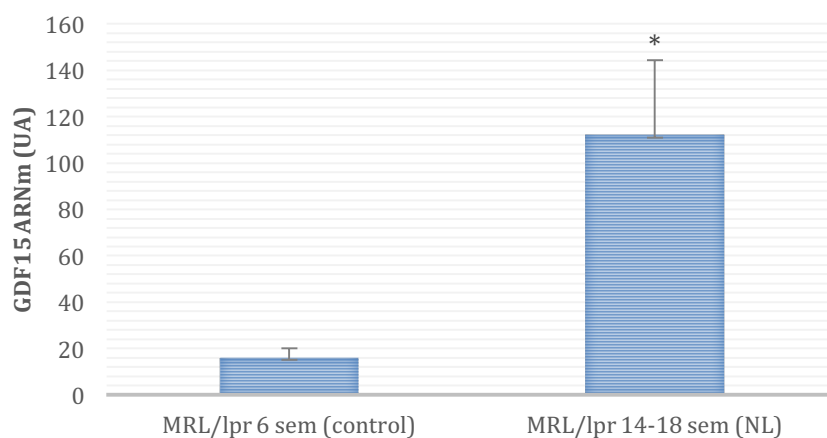
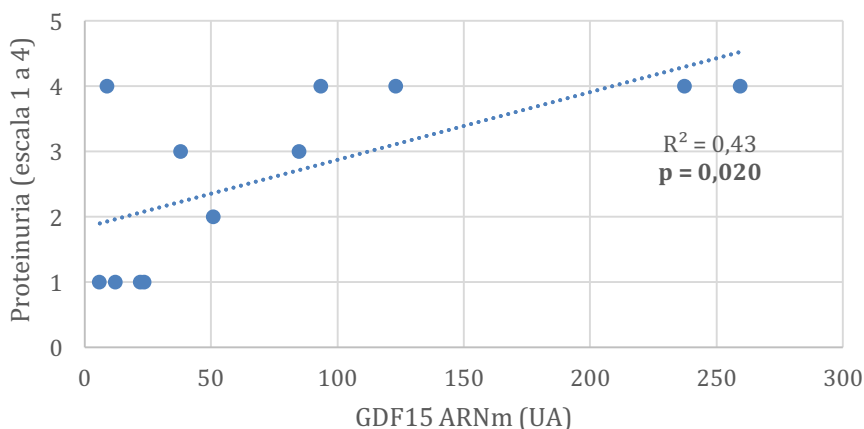


Figura 18 Expresión GDF15 ARNm (UA) en ratones MRL/lpr 6 semanas (control) vs ratones MRL/lpr 14-18 semanas (nefritis lúpica). Datos expresados como media \pm error estándar de la media. NL: nefritis lúpica.

**p=0,034*

Además de estar aumentado de forma significativa en ratones con nefritis lúpica vs control, observamos que al correlacionar valores de proteinuria con GDF15, se aprecia una correlación positiva y estadísticamente significativa, a mayor proteinuria mayor valor de GDF15 (figura 19).



*Figura 19 Correlación entre proteinuria (medido en escala semicuantitativa de 1+ a 4+) vs GDF15 ARNm (UA).
A mayor proteinuria, mayor GDF15.*

Asimismo, existe correlación positiva y estadísticamente significativa entre el número de días con proteinuria máxima (definida como proteinuria de 4+) y el valor de GDF15, a más días con proteinuria máxima, mayor valor de GDF15 (figura 20).

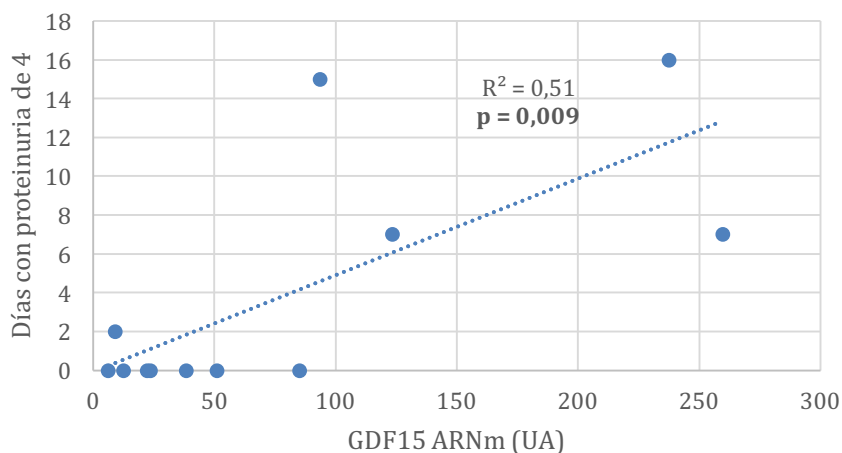


Figura 20 Correlación entre días con proteinuria máxima (4+/4+) y GDF15 ARNm (UA).

La correlación entre días con proteinuria y GDF15 se mantiene, aunque de forma menos llamativa y significativa, si tomamos en cuenta también valores menores de proteinuria, es decir GDF15 es más alto cuanto más grave sea la proteinuria y mientras más días de proteinuria existan (figura 21).

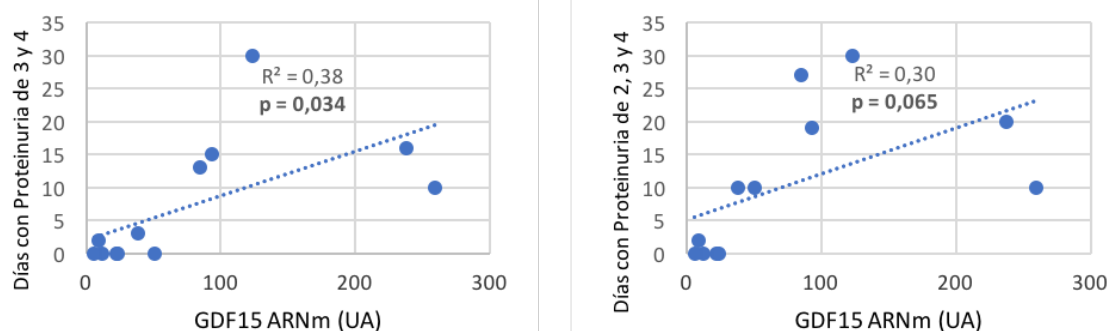


Figura 21 Correlación entre días con proteinuria (2+, 3+ y 4+/4+) y GDF15 ARNm (UA). La mayor expresión de GDF15 se asocia con mayor tiempo de proteinuria y mayor severidad de la misma.

2. Segunda parte: data mining

En la segunda parte del estudio, a la que llamamos “data mining”, realizamos una búsqueda y análisis estadísticos de la base de datos Nephroseq (74). Buscamos todos los estudios de transcriptómica, tanto experimentales como en humanos, realizados previamente por otros investigadores, en diferentes tipos de enfermedades renales, en donde se hubiese medido la expresión de GDF15 en tejido renal, glomérulo o tubulointersticio, para evaluar si los hallazgos que hemos encontrado son generalizables a otras nefropatías experimentales o humanas.

2.1. Estudios experimentales

Encontramos 2 estudios realizados en ratones, el primero realizado en ratones con nefritis lúpica y el segundo en ratones con nefropatía diabética.

El primer estudio analizó tres modelos diferentes de nefritis lúpica (NZW/BXSB, NZM2410 y NZBW), con una aproximación experimental similar a la nuestra, se compara la expresión de GDF15 en tejido renal de ratones de más edad (con nefritis lúpica) con ratones del mismo modelo, pero jóvenes (no habían desarrollado la enfermedad) (85). Se comprobó que en ratones con nefritis lúpica el ARNm de GDF15 se expresa como media 2,9 veces más que en controles (tabla 10 y figura 20).

El segundo estudio se realizó en ratones con nefropatía diabética. Se usaron dos modelos diferentes de nefropatía diabética (eNOS-deficient C57BLKS db/db y DBA/2), y se compararon con otros ratones que no tenían nefropatía diabética. Se analizaron muestras de glomérulos (86). En ambos modelos la expresión de ARNm de GDF15 se encontraba significativamente aumentada, siendo como media 1,96 veces mayor en nefropatía diabética que en controles (tabla 10 y figura 22).

Tabla 10 Expresión en ratones (riñón y glomérulo) de ARNm de GDF15 en distintos estudios transcriptómicos recogidos en la base de datos Nephroseq. NL: nefritis lúpica, ND: nefropatía diabética.

Ref	Tejido	Grupos comparados		Ratio aumento GDF15 A vs B	Valor de P
		Grupo A	Grupo B		
(85)	Riñón	Ratones 13-20 semanas (NZW/BXSB) NL	Ratones 5-8 semanas (NZW/BXSB) Control	2,303	0.002
		Proteinuria NL (NZM2410)	No proteinuria NL (NZM2410)	4,454	0.003
		Ratones 33-36 semanas (NZBW) NL	Ratones 21-24 semanas (NZBW) Control	1,954	0.008
(86)	Glomérulo	ND (eNOS-/-) C57BLKS db/db	Ratones sin ND	2,366	9.05E-4
		ND (DBA/2)	Ratones sin ND	1,568	0.004

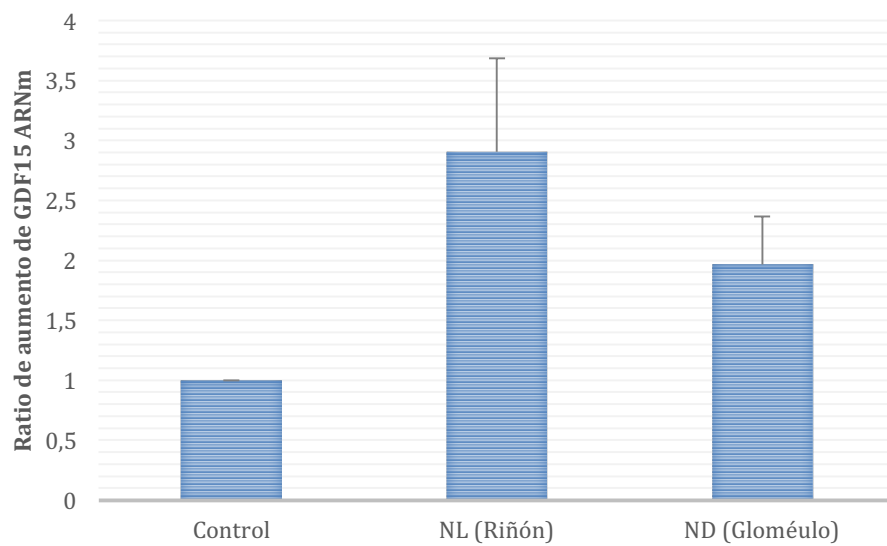


Figura 22 Expresión en ratones (riñón y glomérulo) De ARNm de GDF15 en distintos estudios transcriptómicos recogidos en la base de datos Nephroseq (cita). La figura presenta un resumen de los valores de la tabla 10. Se presentan los valores medios \pm eem de los modelos que evalúan una misma glomerulonefritis.

2.2. Estudios en humanos

Encontramos un total de 8 estudios de transcriptómica realizados en humanos, de los cuales en 7 fueron realizados en riñones con enfermedad renal: 6 en glomerulonefritis y uno en ERC de diversas causas. El estudio restante fue realizado en tejido renal de riñones normales, en el que se estudió la expresión de ARNm GDF15 en los diferentes segmentos del riñón. Nos pareció interesante este análisis para conocer la localización renal en la que más se expresa GDF15 en condiciones normales. De los 6 estudios realizados en glomerulonefritis, en 3 se analizó únicamente la expresión de ARNm de GDF15 en glomérulos y los otros 3 analizaron la expresión de ARNm de GDF15 tanto en glomérulo como en túbulointersticio.

Para el análisis hemos separado este segmento en 4 partes, expresión de GDF15 en tejido renal normal, expresión de GDF15 tejido renal en ERC de diversas causas, expresión de GDF15 en glomérulos en glomerulonefritis y expresión de GDF15 en túbulointersticio en glomerulonefritis.

2.2.1. Expresión de GDF15 en un tejido renal normal

En este estudio se hizo transcriptómica en varios segmentos del riñón en un riñón normal (sin enfermedad renal) (87). La mayor expresión de ARNm de GDF15 ocurre en médula renal (1,5 veces más que en otros segmentos renales, $p=0.002$); y en papila renal (2,5 veces más que en otros segmentos renales, $p=0.004$). Donde existe menos expresión renal de ARNm de GDF15 es en los glomérulos (figura 23).

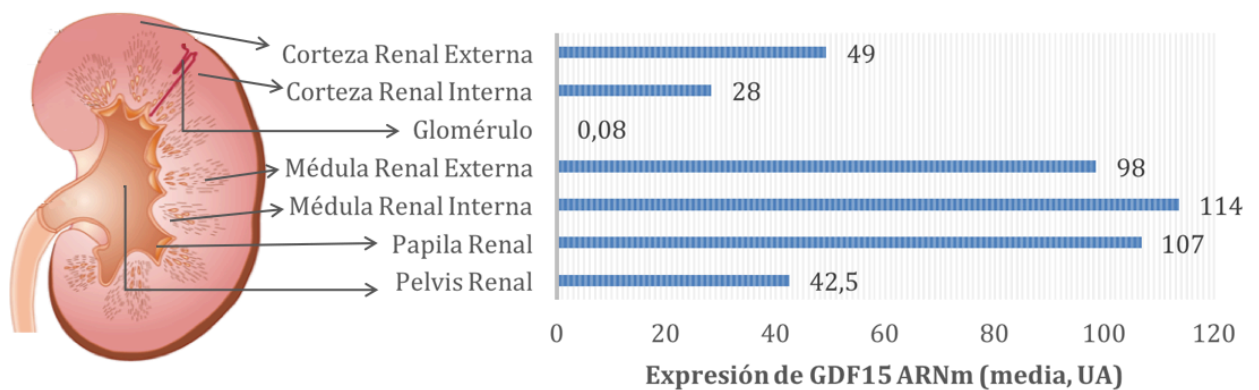


Figura 23 Expresión de GDF15 ARNm en diferentes tejidos de un riñón normal (87).

2.2.2. Expresión de GDF15 en Enfermedad Renal Crónica

En este estudio compararon 48 biopsias de pacientes con ERC de diversas causas con 5 biopsias de riñón normal. En la tabla 11 se aprecia la distribución de causas de ERC de estos pacientes. Se realizó transcriptómica por técnica de Arrays. La expresión de ARNm de GDF15 se encuentra aumentada 2,6 veces en riñones con ERC vs riñón normal ($p= <0,05$). Se comprobó este hallazgo con un grupo de validación de pacientes diferentes, 5 individuos con ERC comparados con 3 controles, en donde la expresión de ARNm de GDF15 se encontraba aumentada 2,3 veces en ERC en comparación con riñón normal ($p= <0,05$) (figura 24) (88).

Tabla 11 Distribución de causas de ERC de pacientes biopsiados en los que se determinó GDF15 (88)

Causa de ERC	Número de pacientes
NIgA	15
NM	7
NL	6
Otras	6
NCM	4
GNMP	3
Amiloidosis	3
ND	2
GN asociada a ANCA	2

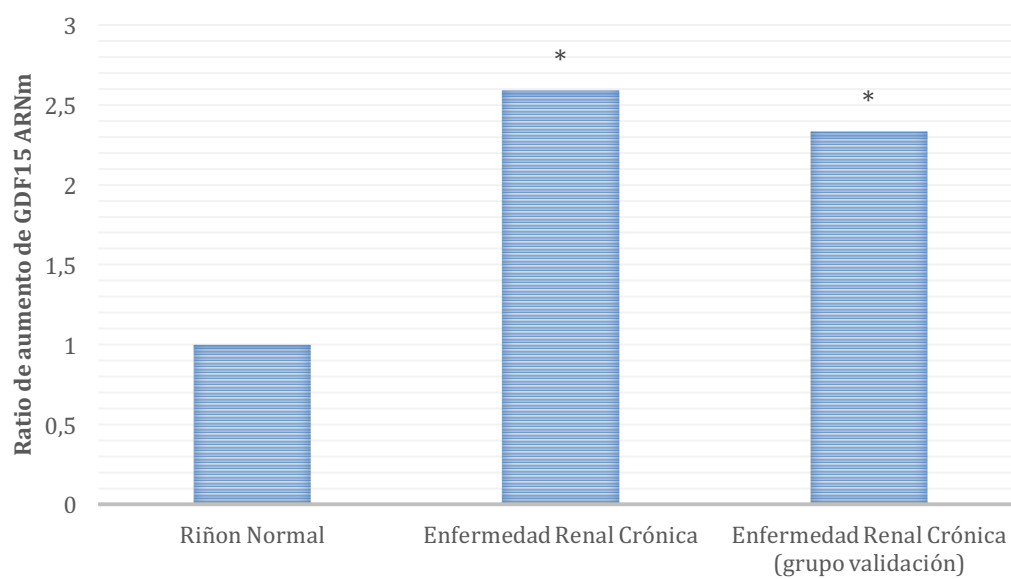


Figura 24 Expresión renal de ARNm de GDF15 según estudios transcriptómicos (88) * $p < 0,05$

2.2.3. Expresión de GDF15 en glomérulos en pacientes con glomerulonefritis

Encontramos 6 estudios realizados en glomerulonefritis en los que se analizaron muestras de glomérulos. En estos estudios se comparaba la expresión de ARNm de glomerulonefritis como GSFS, GSFS colapsante, nefropatía membranosa, NIgA, nefropatía diabética y nefritis lúpica versus riñón normal. La definición de riñón normal varió con el estudio y osciló desde nefropatía de cambios mínimos hasta riñones de donantes vivos, o muestras no tumorales de nefrectomías. También en un estudio se comparó una clase más grave de nefritis lúpica vs una clase menos grave de nefritis lúpica, NL clase IV con NL clase II y III (según la clasificación de la Organización Mundial de la Salud).

En la tabla 12 se resumen los resultados encontrados, en negrita se indican las comparaciones que resultaron estadísticamente significativas ($p < 0,05$). En glomerulonefritis como GSFS, GSFS colapsante, nefropatía diabética y nefritis lúpica la expresión de ARNm de GDF15 se encontraba aumentada de forma significativa comparado con riñón normal. También, al comparar NL clase IV con clases menos graves de la enfermedad como NL clase II y III, se evidencia un aumento de expresión de ARNm de GDF15 estadísticamente significativo.

En la Figura 25 se resumen estos hallazgos. Cabe destacar que no existe diferencia al comparar proteinuria nefrótica de NIgA y nefritis lúpica vs proteinuria no nefrótica de la misma glomerulonefritis.

Los datos de nefropatía membranosa e IgA no son concluyentes. En tres estudios diferentes no se objetivó una diferencia significativa entre nefropatía IgA y diversos controles. En el caso de nefropatía membranosa no se objetivaron diferencias significativas en dos estudios independientes.

Tabla 12 Expresión glomerular de ARNm De GDF15 en distintos estudios transcriptómicos recogidos en la base de datos Nephroseq

Ref	Tejido	Grupos comparados		Ratio aumento GDF15 A vs B	Valor de P
		Grupo A	Grupo B		
(89)	Glomérulo	GSFS	NCM	5,846	0,008
		NIgA	NCM	3,674	0,149
		NM	NCM	2,334	0,102
		ND	NCM	24,242	0,004
		NL	NCM	12,235	0,013
(90)	Glomérulo	GSFS	NCM	1,597	0,069
		NM	NCM	1,212	ns
(91)	Glomérulo	GSFS Colapsante	Riñón Normal	1,194	0,044
		GSFS	Riñón Normal	1,504	ns
(92)	Glomérulo	NIgA	Donantes Renales Vivos	-1,032	ns
		NIgA Proteinuria nefrótica	NIgA Proteinuria subnefrótica	-1,253	ns
(85)	Glomérulo	NL clase IV	NL clase II	2,113	0,006
		NL clase IV	NL clase III	1,627	0,034
		NL Proteinuria nefrótica	NL Proteinuria subnefrótica	1,035	0,168

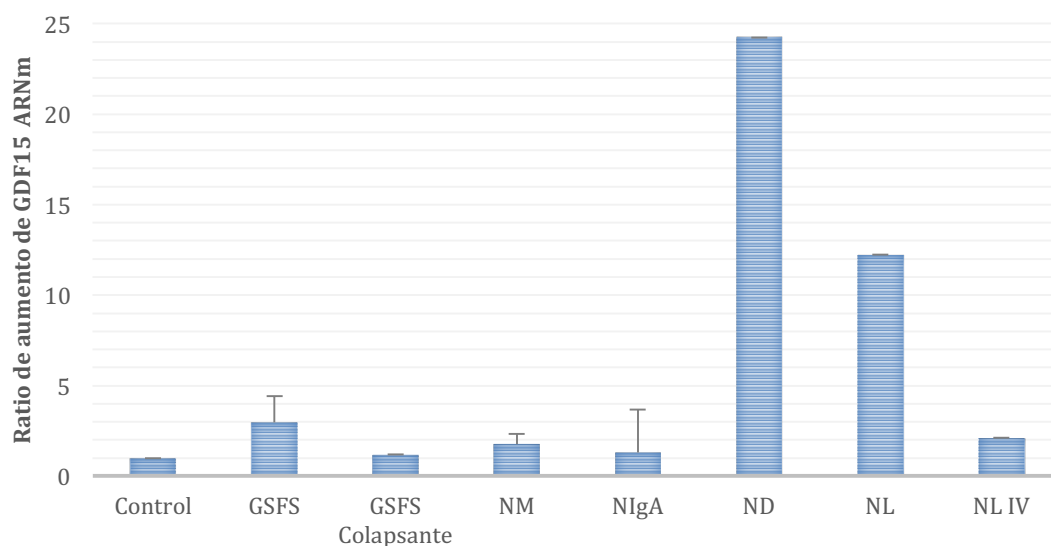


Figura 25 Expresión glomerular de ARNm de GDF15 en distintos estudios transcriptómicos recogidos en la base de datos Nephroseq. La figura presenta un resumen de los valores de la tabla 12. Cuando una misma glomerulonefritis está analizada en varios estudios, se presentan los valores medios \pm eem. Los datos están expresados como ratio con respecto al control, excepto la NL IV que esta expresado con respecto a NL II.

2.2.4. Expresión de GDF15 en Tubulointersticio en Riñones con glomerulonefritis

En 3 estudios realizados en glomerulonefritis se analizaron muestras de túbulointersticio. En estos estudios se comparaba la expresión de ARNm de glomerulonefritis como GSFS, nefropatía membranosa, NIgA con riñón normal. En uno de los estudios la definición de riñón normal fue NCM y en otros riñones de donantes vivos. También en otro estudio se comparó una clase más grave (NL clase IV) con una clase menos grave (NL clase II y III). En la tabla 13 se resumen los resultados encontrados, en negrita se indican las comparaciones que resultaron estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Al igual que en glomérulos, en la GSFS la expresión de GDF15 se encuentra aumentada en comparación con riñón normal. También, al comparar NL clase IV con estadios menos graves de la enfermedad NL clase II, se evidencia un aumento de expresión de ARNm de GDF15 estadísticamente significativo. Sin embargo, al igual que ocurre en glomérulos, tampoco se observó un aumento significativo de la expresión de GDF15 en el tubulointersticio de la nefropatía membranosa o de la nefropatía IgA. En la Figura 26 se resumen estos hallazgos.

Tabla 13 Expresión tubulointersticial de ARNm de GDF15 en distintos estudios transcriptómicos recogidos en la base de datos Nephroseq

Ref	Tejido	Grupos comparados		Ratio aumento GDF15 A vs B	Valor de P
		Grupo A	Grupo B		
(90)	Tubulointersticio	GSFS	NCM	1,919	6,780E-05
		NM	NCM	1,777	ns
(92)	Tubulointersticio	NIgA Proteinuria nefrótica	NIgA Proteinuria subnefrótica	2,973	0,003
		NIgA	Donantes Renales Vivos	1,008	ns
(85)	Tubulointersticio	NL clase IV	NL clase II	2,049	5,78E-04
		NL clase IV	NL clase III	1,371	ns
		NL Proteinuria nefrótica	NL Proteinuria subnefrótica	1,994	3,67E-04

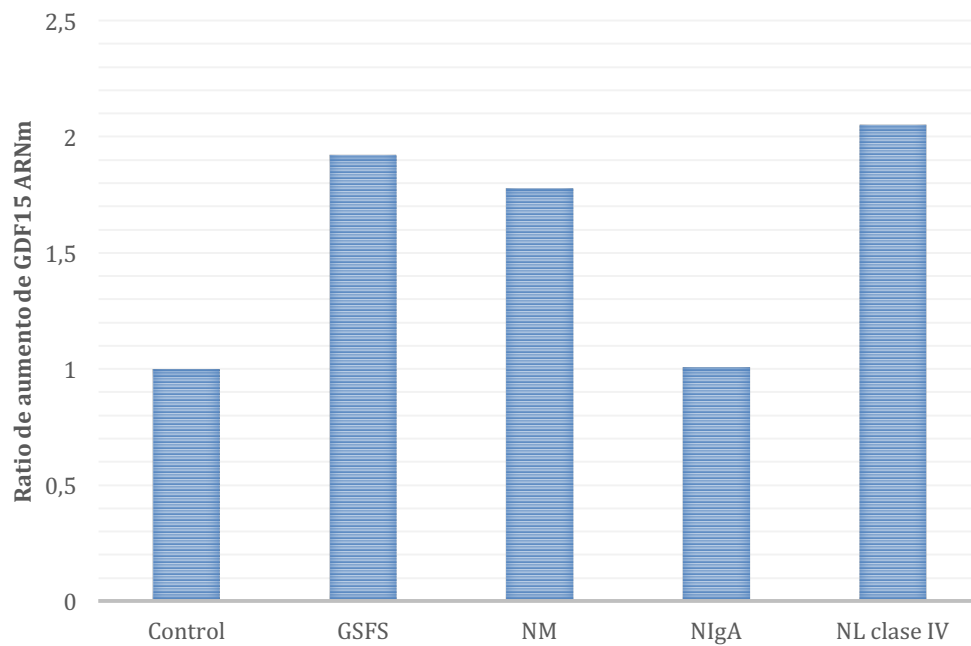


Figura 26 Expresión tubulointersticial de ARNm de GDF15 en distintos estudios transcriptómicos recogidos en la base de datos Nephroseq. La figura presenta un resumen de los valores de la tabla 13. Los datos están expresados como ratio con respecto al control, excepto la NL IV que esta expresado con respecto a NL II.

Un hallazgo importante a destacar es que, a diferencia de análisis realizados en glomérulos, en el tejido túbulointersticio si existe diferencia al comparar NIgA y nefritis lúpica con proteinuria nefrótica vs proteinuria no nefrótica de la misma glomerulopatía (Figura 27).

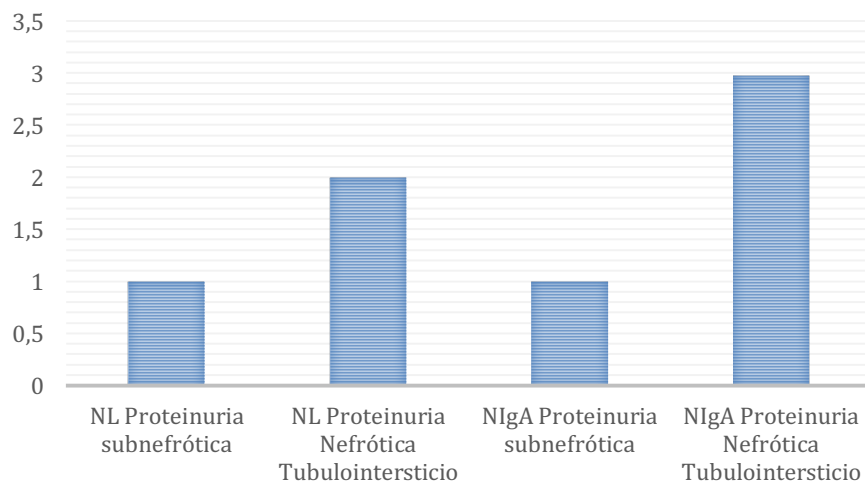


Figura 27 Expresión ARNm GDF15 en tubulointersticio en nefritis lúpica y NIgA, comparación de expresión en pacientes con proteinuria nefrótica vs proteinuria subnephrotic

3. Tercera parte: clínica

En esta sección exploramos los valores de GDF15 en suero y orina de pacientes que fueron sometidos a biopsia renal. Se hicieron correlaciones con datos analíticos basales y con datos de evolución de los pacientes. También se realizó tinción de GDF15 con inmunohistoquímica en muestras de biopsias embebidas en parafinas para valorar la localización de la expresión de GDF15.

3.1.Descripción de la población

Se seleccionaron todos los pacientes (n=84) que fueron sometidos a biopsia renal entre septiembre 2012 y marzo 2017 que firmaron consentimiento informado. Se excluyeron pacientes con serología positiva para virus hepatitis C, virus hepatitis B y virus de Inmunodeficiencia Humana.

La edad media de la población fue de $55 \pm 15,7$ años, 65% varones, 79% se trataba de biopsias de riñón nativo y un 21% de biopsias sobre trasplante renal. En la tabla 14 se pueden observar las principales características de la población. El síndrome clínico más común fue la ERC no filiada (30%), seguido por el síndrome nefrótico (21%), trasplante renal (21%) incluyendo en estos pacientes con biopsia renal por protocolo y sospecha de rechazo, seguido de alteraciones urinarias asintomáticas (17%). La mayoría de los pacientes se encontraban en categorías G3, G4 y G5 (70%) y también un 70% se encontraban en la categoría A3 de ERC. Un 35% tenían hematíes en el sedimento de orina, considerándose positivo >5 hematíes/campo.

En relación al resto de parámetros analíticos que conforman el perfil glomerular, 7% de los pacientes tenían paraproteína en sangre (kappa o lambda), 5% anti DNA positivo, 10% ANA positivo, 11% ANCA positivo, siendo ANCA MPO 7% y ANCA PR3 2%, ninguno con anti MBG positivo, 25% tenían IgA elevada y en relación al complemento: 13% y 4% tenían un C3 y C4 disminuido respectivamente.

Tabla 14 Principales características de la población. Datos expresados como media \pm DE o n (%).

Características de la población		
Edad (años)		55 \pm 15,73
Varones		53/84 (63)
DM		18/84 (21)
HTA		58/84 (69)
Muestra	Riñón nativo	66/84 (79)
	Trasplante	18/84 (21)
Síndrome clínico	ERC	25/84 (30)
	Síndrome nefrótico	18/84 (21)
	Trasplante	18/84 (21)
	Alteraciones urinarias asintomáticas	14/84 (17)
	FRA	9/84 (11)
Cr (mg/dl)		2,18 \pm 1,84
FGe (ml/min/1.73 m ²)		51,7 \pm 35,7
Categorías G de ERC	G1	14/84 (17)
	G2	12/84 (14)
	G3	29/84 (35)
	G4 - 5	29/84 (35)
Categorías A de ERC	A1	12/84 (14)
	A2	13/84 (14)
	A3	59/84 (70)
Hematíes en sedimento	< 5 hematíes/campo	53/82 (65)
	> 5 hematíes/campo	29/82 (35)
Albúmina (g/dl)		3,5 \pm 0,9
Fósforo (mg/dl)		3,9 \pm 1,2
Colesterol total (mg/dl)		210,8 \pm 72,2
Hb (g/dl)		12,3 \pm 2,3
Glucemia (mg/dl)		104,7 \pm 43,3
Presencia de paraproteína		6/84 (7)
ANA +		8/84 (10)
AntiDNA +		4/84 (5)
ANCA +		10/84 (12)
ANCA PR3 +		2/84 (2)
ANCA MPO +		6/84 (7)
AntiMBG +		0/84 (0)
IgA (mg/dl)	valor	301 \pm 142
	>350	21/84 (25)
C3 (mg/dl)	valor	119 \pm 36
	<90	11/84 (13)
C4 (mg/dl)	valor	35 \pm 13
	<12	3/84 (4)

En las figuras 28 y 29 se representan los diagnósticos obtenidos mediante la biopsia renal, en figura 28 se clasifica a la población en grandes categorías y en la figura 29 en diagnóstico específicos. Los diagnósticos más frecuentes fueron glomerulonefritis tanto inflamatorias como no inflamatorias, y dentro de estas las más frecuentes fueron GSFS (11%), nefritis lúpica (11%) y NIgA (10%).

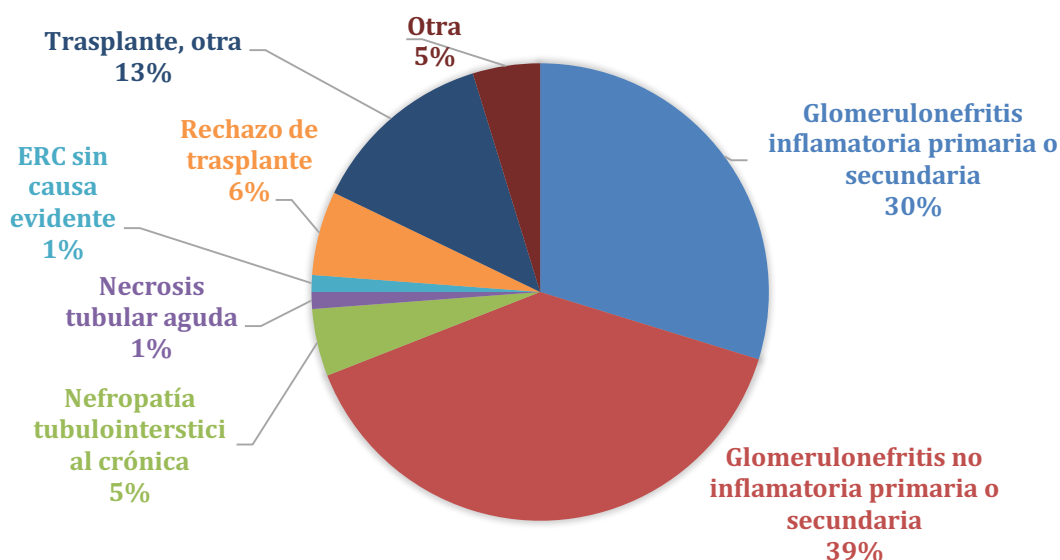


Figura 28 Diagnósticos de los pacientes, obtenidos mediante la biopsia renal, agrupados en grandes categorías

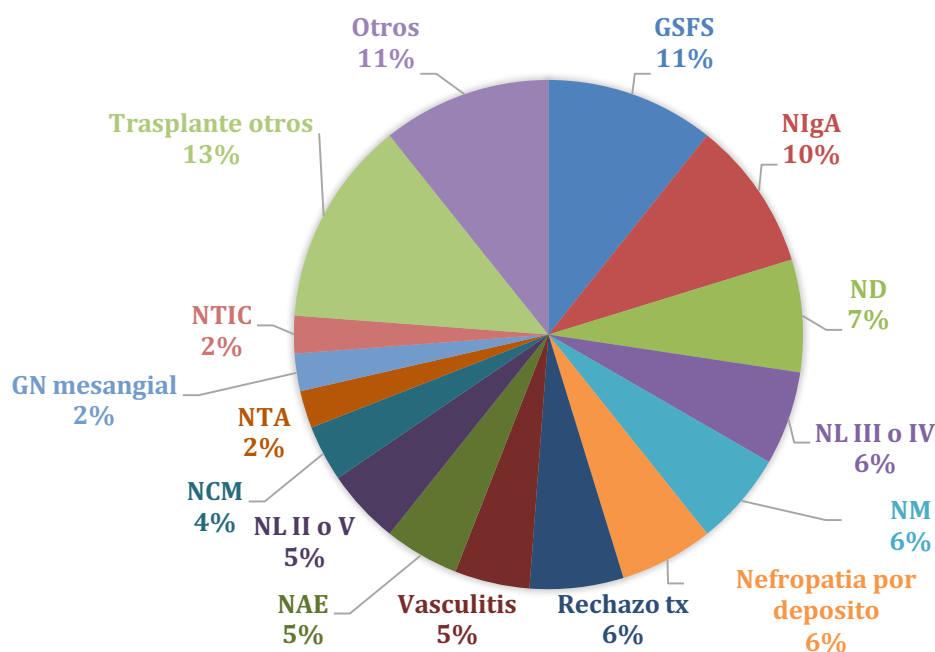


Figura 29 Diagnósticos de los pacientes, obtenidos mediante la biopsia renal, agrupados en pequeñas categorías, por diagnósticos específicos.

En la tabla 15 se resumen los principales hallazgos de las biopsias renales, la media de glomérulos en las biopsias fue $17,5 \pm 10,6$, de los cuales como media un 18% estaban esclerosados, 25% de las biopsias tenían signos de actividad, 12% presencia de semilunas y 35% presencia de lesiones de GSFS.

Tabla 15 Datos de las biopsias renales. Los datos están expresados en media \pm DE o n (%). Los porcentajes de actividad, semilunas, atrofia y fibrosis están expresados sobre el total de glomérulos que tienen datos de actividad, semilunas, atrofia y fibrosis respectivamente.

Datos de las biopsias		
Glomérulos	número	$17,5 \pm 10,6$
	% esclerosados	$18,3 \pm 19,5$
Actividad	si	21/84 (25)
	% de actividad/21	$42,5 \pm 29,7$
Semilunas	si	10/84 (12)
	% semilunas de/10	39 ± 25
Atrofia	si	53/84 (63)
	% de atrofia/53	25 ± 19
Fibrosis	si	56/84 (67)
	% de fibrosis/56	25 ± 19
Lesiones de GSFS	si	29/84 (35)

3.2. Análisis transversal de valores de GDF15

Se obtuvieron muestras de sangre y orina de los pacientes previo a la realización de la biopsia renal. De 11/84 (13%) no pudimos obtener muestra de orina y de 2/84 pacientes (2%) no pudimos extraer muestra de sangre. En total se midió GDF15 en orina en 73 pacientes y en suero en 82 pacientes. De 71 pacientes existen muestras tanto de suero como de orina.

3.2.1. GDF15 en pacientes en comparación con controles

Medimos GDF15 en orina de 7 controles sanos, y en suero de 8 controles sanos. Existe una diferencia significativa entre valores de GDF15 entre pacientes y controles sanos, tanto en suero como en orina. En la tabla 16 se aprecia la comparación de medias de valores de GDF15 en pacientes y controles.

Tabla 16 Valores de GDF15 en pacientes y controles. Datos expresados como media \pm desviación estándar. La significación estadística se indica en negritas.

GDF15	Pacientes	Controles	p
Suero ng/ml	2,5 \pm 1,7	0,4 \pm 0,1	<0,001
Orina ng/mg	11,2 \pm 7,7	2,9 \pm 1,7	<0,001

3.2.2. Correlación de niveles de GDF15 en suero con niveles de GDF15 en orina

Existe una correlación alta y estadísticamente significativa, entre niveles de GDF15 en suero y orina (figura 30).

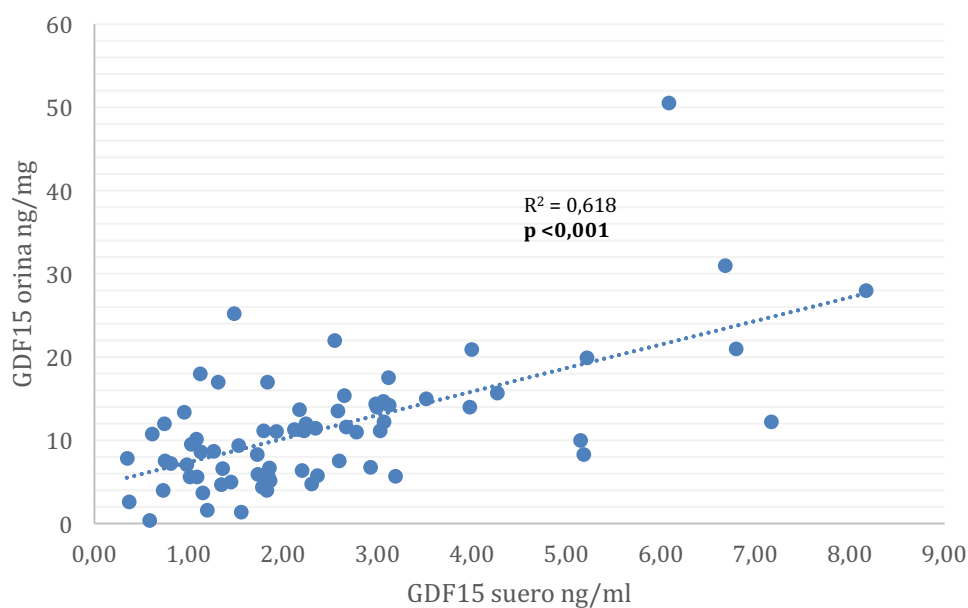


Figura 30 Correlación entre niveles de GDF15 en suero y GDF15 en orina.

3.2.3. GDF15 por sexo

No existen diferencias significativas al comparar los valores de GDF15 en suero, orina, aclaramiento de GDF15, aclaramiento GDF15/FGe y GDF15orina/(MAU/Cr), entre hombres y mujeres (Tabla 17).

Tabla 17 Valores de GDF15 en suero y orina en hombres y mujeres. Datos expresados como media \pm desviación estándar.

GDF15	Hombres	Mujeres	p
GDF15 suero ng/ml	2,63 \pm 1,83	2,20 \pm 1,46	ns
GDF15 orina ng/mg	11,88 \pm 8,91	10,00 \pm 4,52	ns
Aclaramiento GDF15	3,83 \pm 2,89	3,62 \pm 3,39	ns
Aclaramiento GDF15/FGe	0,10 \pm 0,08	0,08 \pm 0,08	ns
GDF15 orina/(MAU/Cr)	0,15 \pm 0,32	0,11 \pm 0,23	ns

Aclaramiento GDF15 expresado en ml/min, FGe en ml/min/m² y MAU/Cr en mg/gr

3.2.4. GDF15 por categorías de ERC: Filtrado glomerular

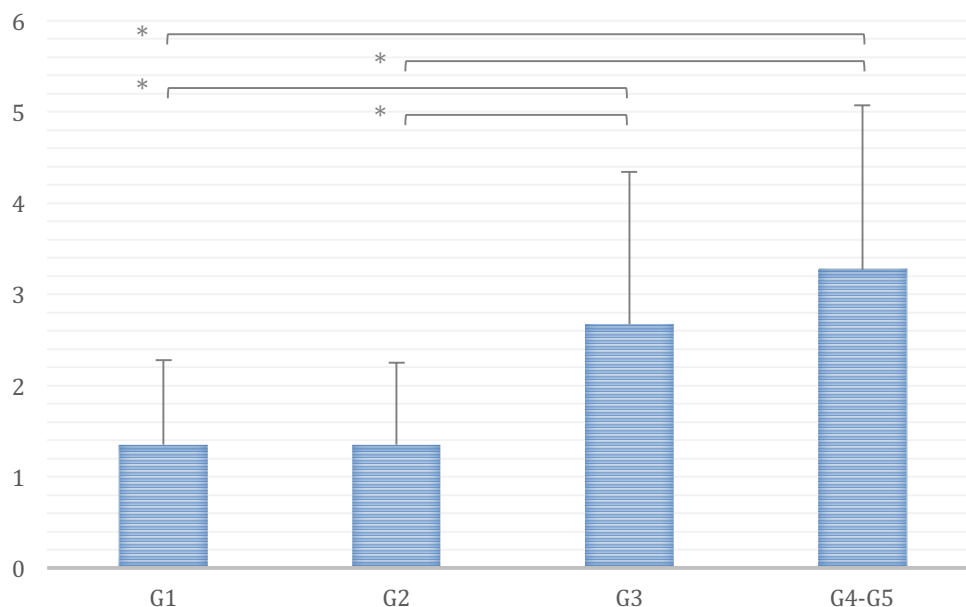
Separamos los valores de GDF15 en suero, orina, aclaramiento de GDF15, aclaramiento de GDF15 dividido entre FG estimado y GDF15 en orina dividido entre la microalbuminuria, por categoría de ERC dependientes de FG: G1, G2, G3 y G4-G5. En la tabla 18 se indican los valores medios y la significación estadística.

Tabla 18 GDF15 en suero, GDF15 orina, aclaramiento de GDF15, aclaramiento GDF15/FGe y GDF15orina/(MAU/Cr), por categoría de ERC dependiente de FG: G1, G2, G3 y G4-G5. Datos expresados como media \pm desviación estándar. La significación estadística se indica en negritas.

GDF15	G1	G2	G3	G4-G5	p
GDF15 suero ng/ml	1,35 \pm 0,93	1,35 \pm 0,9	2,67 \pm 1,67	3,27 \pm 1,8	<0,001
GDF15 orina ng/mg	9,96 \pm 5,39	9,33 \pm 6,32	12,37 \pm 10,16	11,48 \pm 5,97	ns
Aclaramiento GDF15	5,76 \pm 5,2	5,03 \pm 3,28	3,54 \pm 1,92	2,40 \pm 1,6	0,025
Aclaramiento GDF15/FGe	0,05 \pm 0,05	0,07 \pm 0,05	0,08 \pm 0,05	0,13 \pm 0,11	0,009
GDF15 orina/(MAU/Cr)	0,07 \pm 0,23	0,06 \pm 0,14	0,19 \pm 0,37	0,13 \pm 0,27	0,031

Aclaramiento GDF15 expresado en ml/min, FGe en ml/min/m² y MAU/Cr en mg/gr

Existen diferencias significativas al 95% ($p < 0,001$) entre las diferentes categorías de ERC en GDF15 en suero. Las diferencias se encuentran entre los grupos G3 y G4-G5 en comparación con G1 y G2. Los valores de GDF15 en suero son significativamente mayores en los grupos G3 y G4-5 (figura 30).



*Figura 31 GDF15 en suero ng/ml, en las diferentes categorías de ERC. * $p < 0,05$. Datos expresados en media, las barras de error representan la desviación estándar.*

También existen diferencias significativas al 95% ($p 0,025$) al comparar aclaramiento de GDF15 en las diferentes categorías de ERC, existiendo la diferencia en este caso entre los grupos G4-G5 y G2. En el caso de Aclaramiento GDF15/FGe ($p 0,009$) las diferencias existen entre G1 y G4-G5, y en el caso de GDF15orina/(MAU/Cr) ($p 0,031$), las diferencias existen entre G1 y G3, G4-G5.

Es llamativo que en el GDF15 en orina no existen diferencias en los diferentes grupos de FG. El GDF15 en orina no se modifica en función de FG.

3.2.5. GDF15 por categoría de ERC: Albuminuria

Separamos los valores de GDF15 en suero, orina, aclaramiento de GDF15, aclaramiento de GDF15 dividido entre FG estimado y GDF15 en orina dividido entre la microalbuminuria, por las categorías de ERC dependientes de la albuminuria: A1, A2 y A3. En la tabla 19 se indican los valores medios y la significación estadística.

Tabla 19 GDF15 en suero, GDF15 orina, aclaramiento de GDF15, aclaramiento GDF15/FG y GDF15orina/(MAU/Cr), por categoría de ERC dependiente de Albuminuria: A1, A2 y A3. Datos expresados como media \pm desviación estándar. La significación estadística se indica en negritas.

GDF15	A1	A2	A3	p
GDF15 suero ng/ml	2,34 \pm 1,82	1,92 \pm 0,65	2,55 \pm 1,81	ns
GDF15 orina ng/mg	13,37 \pm 4,59	8,58 \pm 4,78	11,49 \pm 8,62	ns
Aclaramiento GDF15	4,87 \pm 3,31	3,38 \pm 2,3	3,62 \pm 3,19	ns
Aclaramiento GDF15/FG	0,11 \pm 0,05	0,13 \pm 0,11	0,09 \pm 0,08	ns
GDF15 orina/(MAU/Cr)	0,8 \pm 0,26	0,11 \pm 0,10	0,01 \pm 0,01	<0,001

Aclaramiento GDF15 expresado en ml/min, FG en ml/min/m² y MAU/Cr en mg/gr

No existe diferencia de los valores de GDF15 en suero y orina en función de los valores de albuminuria. La única diferencia significativa que encontramos fue en GDF15orina/(MAU/Cr) pero que en este caso probablemente la diferencia se deba a cambios en la albuminuria más que el valor de GDF15.

3.2.6. GDF15 en función de hematuria

Separamos los valores de GDF15 en suero, orina, aclaramiento de GDF15, aclaramiento de GDF15 dividido entre FG estimado y GDF15 en orina dividido entre la microalbuminuria, por la existencia o no de hematuria en sedimento de orina. GDF15 no se modifica en función de la hematuria del paciente. En la tabla 20 se indican los valores medios y la significación estadística.

Tabla 20 GDF15 en suero, GDF15 orina, aclaramiento de GDF15, aclaramiento GDF15/FGe y GDF15orina/(MAU/Cr), en función de hematuria. Datos expresados como media \pm desviación estándar.

GDF15	Hematuria negativa	Hematuria positiva	p
GDF15 suero ng/ml	2,13 \pm 1,26	3,09 \pm 2,21	ns
GDF15 orina ng/mg	11,55 \pm 8,02	10,93 \pm 7,17	ns
Aclaramiento GDF15	4,03 \pm 2,76	3,44 \pm 3,72	ns
Aclaramiento GDF15/FGe	0,09 \pm 0,07	0,1 \pm 0,09	ns
GDF15 orina/(MAU/Cr)	0,19 \pm 0,34	0,04 \pm 0,14	ns

Aclaramiento GDF15 expresado en ml/min, FGe en ml/min/m² y MAU/Cr en mg/gr

3.2.7. GDF15 en función del FG y la Albuminuria

Las tablas 21 a 25 muestran la distribución de los valores de las diferentes variables en matrices 2x2 representando las diferentes categorías de G de FGe y A de albuminuria. En gris las casillas con menos de 3 muestras.

Tabla 21 GDF15 en suero ng/ml según categoría de ERC, filtrado glomerular y albuminuria. Datos expresados como media \pm desviación estándar. Los valores obtenidos de uno o dos pacientes se indican en color gris. Los datos obtenidos de un paciente no tienen desviación estándar por tratarse de un solo valor.

GDF15 suero ng/ml	A1	A2	A3	Total
G1	0,57 \pm 0,18		1,48 \pm 0,91	1,35 \pm 0,9
G2	0,95	1,01	1,42 \pm 0,92	1,34 \pm 0,86
G3	3,14 \pm 2,18	1,74 \pm 0,59	2,81 \pm 1,61	2,67 \pm 1,64
G4/G5	2,69 \pm 1,09	2,2 \pm 0,47	3,71 \pm 2	3,27 \pm 1,77
Total	2,34 \pm 1,74	1,92 \pm 0,62	2,55 \pm 1,8	2,47 \pm 1,69

Tabla 22 GDF15 en orina ng/mg según categoría de ERC, filtrado glomerular y albuminuria. Datos expresados como media \pm desviación estándar. Los valores obtenidos de uno o dos pacientes se indican en color gris. Los datos obtenidos de un paciente no tienen desviación estándar por tratarse de un solo valor

GDF15 orina ng/mg	A1	A2	A3	Total
G1	12		9,77 \pm 5,35	9,96 \pm 5,16
G2	13,36	5,66	9,29 \pm 6,41	9,33 \pm 6,03
G3	15,91 \pm 5,63	11,92 \pm 4,37	12,02 \pm 11,53	12,37 \pm 9,97
G4/G5	11,18 \pm 2,01	6,84 \pm 4,02	13,72 \pm 6,4	11,48 \pm 5,99
Total	13,37 \pm 4,36	8,58 \pm 4,56	11,49 \pm 8,53	11,24 \pm 7,66

Tabla 23 Aclaramiento de GDF15 en ml/min según categoría de ERC, filtrado glomerular y albuminuria. Datos expresados como media \pm desviación estándar. Los valores obtenidos de uno o dos pacientes se indican en color gris. Los datos obtenidos de un paciente no tienen desviación estándar por tratarse de un solo valor

Aclaramiento GDF15 ml/min	A1	A2	A3	Total
G1	11,33		5,29 \pm 4,93	5,76 \pm 5
G2	9,79	3,89	4,67 \pm 3,05	5,03 \pm 3,14
G3	4,53 \pm 1,79	5,22 \pm 2,41	2,96 \pm 1,36	3,54 \pm 1,88
G4/G5	2,86 \pm 1,46	2,07 \pm 0,97	2,39 \pm 1,74	2,4 \pm 1,57
Total	4,87 \pm 3,16	3,38 \pm 2,2	3,62 \pm 3,16	3,75 \pm 3,06

Tabla 24 Ratio aclaramiento de GDF15/FGe según categoría de ERC, filtrado glomerular y albuminuria. Datos expresados como media \pm desviación estándar. Los valores obtenidos de uno o dos pacientes se indican en color gris. Los datos obtenidos de un paciente no tienen desviación estándar por tratarse de un solo valor

Aclaramiento GDF15/FGe	A1	A2	A3	Total
G1	0,12		0,05 \pm 0,05	0,05 \pm 0,05
G2	0,14	0,06	0,06 \pm 0,04	0,07 \pm 0,05
G3	0,10 \pm 0,03	0,12 \pm 0,06	0,07 \pm 0,04	0,08 \pm 0,04
G4/G5	0,11 \pm 0,06	0,14 \pm 0,13	0,14 \pm 0,1	0,13 \pm 0,1
Total	0,11 \pm 0,04	0,13 \pm 0,11	0,09 \pm 0,08	0,09 \pm 0,08

Aclaramiento GDF15 expresado en ml/min, FGe en ml/min/m²

Tabla 25 Ratio GDF15 en orina/(MAU/Cr) según categoría de ERC, filtrado glomerular y albuminuria. Datos expresados como media \pm desviación estándar. Los valores obtenidos de uno o dos pacientes se indican en color gris. Los datos obtenidos de un paciente no tienen desviación estándar por tratarse de un solo valor

GDF15 orina /(MAU/Cr)	A1	A2	A3	Total
G1	0,784		0,004 \pm 0,007	0,069 \pm 0,216
G2	0,448	0,167	0,011 \pm 0,016	0,065 \pm 0,13
G3	1 \pm 0,166	0,194 \pm 0,095	0,008 \pm 0,006	0,189 \pm 0,360
G4/G5	0,694 \pm 0,208	0,044 \pm 0,036	0,008 \pm 0,007	0,131 \pm 0,267
Total	0,801 \pm 0,248	0,11 \pm 0,096	0,008 \pm 0,009	0,132 \pm 0,287

GDF15 orina expresado en ng/mg, MAU/Cr en mg/gr

3.2.8. Relación GDF15 con variables basales clínicas y analíticas

Separamos a la población por cuartiles de valores de GDF15 en suero y GDF15 en orina. De esta forma podríamos valorar si existe diferencia en la distribución de la población de los diferentes cuartiles en cada una de las variables basales. Los datos se muestran en las tablas 26 y 27.

Tabla 26 Datos clínicos y analíticos basales de pacientes a quienes se determinó GDF15 en suero, distribuido en cuartiles por valores de GDF15 en suero. Los datos están expresados como media \pm desviación estándar o n (%).

*estadísticamente significativo. ns: no significativo, na: no se pudo calcular por exceso de valores "0" en la muestra. Se indica el valor de p solo si es significativo o si es un valor de 0,1 o menor.

GDF15 suero ng/ml		Q1	Q2	Q3	Q4	Total	p
Pacientes		20/82	21/82	21/82	20/82	82	
Varones		11/20 (55%)	14/21 (67%)	11/21 (52%)	15/20 (75%)	51/82 (62%)	ns
Edad		50 \pm 8	50 \pm 15,6	58 \pm 14,3	64 \pm 13,9	55 \pm 13	0,018
Riñón Nativo		15/20 (75%)	16/21 (76%)	18/21 (86%)	15/20 (75%)	64/82 (78%)	ns
Trasplante		5/20 (25%)	5/21 (24%)	3/21 (14%)	5/20 (25%)	18/82 (22%)	
HTA		12/19 (63%)	15/21 (71%)	15/20 (75%)	15/20 (75%)	57/80 (71%)	ns
DM		2/19 (11%)	3/21 (14%)	5/20 (25%)	8/20 (40%)	18/80 (23%)	0,11
analítica basal	Cr	1,1 \pm 0,5	1,9 \pm 0,9	2,4 \pm 2,2	3,4 \pm 2,4	2,2 \pm 1,5	<0,001
	FGe	78 \pm 30	50 \pm 30	49 \pm 42	29 \pm 20	52 \pm 31	<0,001
	Albúmina	3,9 \pm 0,8	3,7 \pm 0,8	3,5 \pm 0,8	3,1 \pm 0,8	3,5 \pm 0,8	0,006
	Fósforo	3,6 \pm 0,5	3,8 \pm 0,9	4,2 \pm 1,6	4,2 \pm 1,4	3,9 \pm 1,1	ns
	Colesterol Total	231 \pm 82	225 \pm 88	210 \pm 56	186 \pm 55	213 \pm 70	0,12
	Hb	13,7 \pm 2	12,7 \pm 1,6	12 \pm 1,8	11,1 \pm 1,9	12,4 \pm 1,8	0,001
	Glucemia	98 \pm 30	98 \pm 25	119 \pm 70	108 \pm 34	106 \pm 40	ns
	Leucocitos (orina)	2 \pm 6	2 \pm 6	3 \pm 6	5 \pm 8	3 \pm 6	0,17
	Hematíes (orina)	5 \pm 9	5 \pm 7	6 \pm 10	11 \pm 11	7 \pm 9	0,15
MAU/Cr		1608 \pm 2713	1494 \pm 1645	2962 \pm 4831	6975 \pm 14596	3260 \pm 5946	0,031
biopsia	% actividad	11 \pm 20	11 \pm 24	9 \pm 25	13 \pm 28	11 \pm 24	ns
	% glomérulos esclerosados	9 \pm 12	18 \pm 20	22 \pm 24	19 \pm 16	17 \pm 18	ns
	% atrofia	9 \pm 14	20 \pm 19	22 \pm 23	17 \pm 21	17 \pm 19	na
	% fibrosis	11 \pm 14	20 \pm 19	25 \pm 23	18 \pm 20	18 \pm 19	na
	GSFS (si)	8/17 (47%)	9/21 (43%)	5/19 (26%)	4/18 (22%)	26/75 (35%)	ns
	Semilunas (si)	1/17 (6%)	2/21 (10%)	2/20 (10%)	4/19 (21%)	9/77 (12%)	ns
	% semilunas	1 \pm 5	2 \pm 7	3 \pm 13	11 \pm 25	4 \pm 12	na

Unidades: Cr mg/dl, FGe ml/min/1.73 m², Hb g/dl, albúmina g/dl, colesterol total mg/dl, fósforo mg/dl, glucemia mg/dl

En los cuartiles de valores de GDF15 en suero (tabla 26) existen diferencias al 95% (p<0,05) entre los siguientes grupos:

- Edad, la diferencia se encuentra entre Q1 y Q2 vs Q4, lo que indica que los pacientes con más GDF15 tienen más edad que los grupos con valores inferiores de GDF15.
- Cr basal: Q1 es menor significativamente que Q2, Q3 y Q4.
- FG basal: Q1 es menor significativamente que Q3 y Q4

- Albúmina: Q1 y Q2 son menores significativamente que Q4.
- Hb: Q1 es menor significativamente que Q4.
- MAU/Cr: Q1 es menor significativamente que Q4.

Tabla 27 Datos clínicos y analíticos basales de pacientes a quienes se determinó GDF15 en orina, distribuido en cuartiles por valores de GDF15 en orina. Los datos están expresados como media \pm desviación estándar o n (%).

*estadísticamente significativo. ns: no significativo, na: no se pudo calcular por exceso de valores "0" en la muestra. Se indica el valor de P solo si es significativo (en negrita) o si es un valor de 0,1 o menor.

GDF15 orina ng/mg		Q1	Q2	Q3	Q4	Total	p
Pacientes		18/73	19/73	18/73	18/73	73	
Varones		11/18 (61%)	14/19 (74%)	10/18 (56%)	13/18 (72%)	48/73 (66%)	ns
Edad		49 \pm 15,5	54 \pm 12,6	56 \pm 16	62 \pm 18	55 \pm 15	0,08
Riñón Nativo		14/18 (78%)	15/19 (79%)	14/18 (78%)	13/18 (72%)	56/73 (77%)	ns
Trasplante		4/18 (22%)	4/19 (21%)	4/18 (22%)	5/18 (28%)	17/73 (23%)	
HTA		12/18 (67%)	15/18 (83%)	12/18 (67%)	12/18 (67%)	51/72 (71%)	ns
DM		3/18 (17%)	3/18 (17%)	3/18 (17%)	7/18 (39%)	16/72 (22%)	ns
analítica basal	Cr	1,7 \pm 1	1,8 \pm 1,4	2,2 \pm 2,1	2,5 \pm 1,9	2,1 \pm 1,6	ns
	FGe	57 \pm 33	57 \pm 38	55 \pm 37	42 \pm 32	53 \pm 35	ns
	Albúmina	3,8 \pm 0,8	3,8 \pm 0,7	3,7 \pm 0,7	3,1 \pm 1	3,6 \pm 0,8	0,12
	Fósforo	3,8 \pm 0,8	3,8 \pm 0,9	3,7 \pm 1,4	3,9 \pm 1,4	3,8 \pm 1,1	ns
	Colesterol Total	235 \pm 78	210 \pm 53	188 \pm 45	205 \pm 79	209 \pm 64	0,12
	Hb	13,7 \pm 1,9	12,9 \pm 2	12 \pm 1,7	11,2 \pm 1,4	12,5 \pm 1,7	0,001
	Glucemia	96 \pm 22	97 \pm 24	104 \pm 30	107 \pm 36	101 \pm 28	ns
	Leucocitos (orina)	3 \pm 7	3 \pm 6	3 \pm 8	2 \pm 6	3 \pm 7	ns
	Hematíes (orina)	5 \pm 8	10 \pm 11	6 \pm 10	5 \pm 8	7 \pm 9	ns
	MAU/Cr	1667 \pm 1604	4909 \pm 15348	1567 \pm 2217	3678 \pm 3594	2955 \pm 5691	0,17
biopsia	% actividad	5 \pm 11	14 \pm 23	4 \pm 10	22 \pm 34	11 \pm 20	ns
	% glomérulos esclerosados	21 \pm 18	19 \pm 22	13 \pm 18	19 \pm 21	18 \pm 20	ns
	% atrofia	21 \pm 20	13 \pm 16	11 \pm 12	22 \pm 27	17 \pm 19	na
	% fibrosis	21 \pm 21	13 \pm 17	15 \pm 15	23 \pm 26	18 \pm 20	na
	GSFS (si)	10/18 (56%)	10/18 (56%)	2/16 (13%)	3/17 (18%)	25/69 (36%)	0,007
	Semilunas (si)	2/18 (11%)	4/18 (22%)	0/16 (0%)	4/18 (22%)	10/70 (14%)	ns
	% semilunas	1 \pm 3	7 \pm 16	0	12 \pm 25	5 \pm 11	na

Unidades: Cr mg/dl, FGe ml/min/1.73 m², Hb g/dl, albúmina g/dl, colesterol total mg/dl, fósforo mg/dl, glucemia mg/dl

En los cuartiles de GDF15 en orina (tabla 27), se objetivaron las diferencias al 95% ($p < 0,05$) entre en los grupos para Hb, donde Q1 y Q2 son significativamente menores que Q4. También existieron diferencias estadísticamente significativas en la presencia de lesiones de GSFS en biopsia: niveles mayores de GDF15 en orina se asocian con menos lesiones de GSFS en la biopsia, la diferencia es significativa en el grupo Q3 con respecto al resto. A diferencia que GDF15 en suero, en los grupos de GDF15 en orina no se objetivó diferencia estadísticamente significativa entre edad, Cr, FG, albúmina y MAU/Cr.

3.2.9. Correlaciones univariantes de GDF15

Realizamos estudio de correlaciones univariantes de los valores de GDF15 en suero y orina con las variables Cr basal, FGe basal, albúmina, fósforo, colesterol, hemoglobina, glucemia, leucocitos en orina, hematíes en orina, albuminuria y pendiente de pérdida de FG. Los valores de las correlaciones y la significación estadística se muestran en la tabla 28.

Tabla 28 Correlaciones univariantes de GDF15 en suero y orina, con variables seleccionadas y ajustado por sexo. Valores expresados como: correlación (valor de p). Los valores significativos se señalan en negrita.

Variables	GDF15 suero ng/ml			GDF15 orina ng/mg		
	Todos	Mujer	Hombre	Todos	Mujer	Hombre
Cr basal	0,506 (<0,001)	0,263 (0,15)	0,622 (<0,001)	0,185 (0,117)	0,115 (ns)	0,201 (0,17)
FG basal	-0,464 (<0,001)	-0,422 (0,018)	-0,502 (<0,001)	-0,158 (0,18)	-0,133 (ns)	-0,167 (ns)
Albúmina	-0,429 (<0,001)	-0,352 (0,052)	-0,515 (<0,001)	-0,397 (0,001)	-0,216 (ns)	-0,501 (<0,001)
Fósforo	0,299 (0,007)	0,27 (0,142)	0,377 (0,007)	0,077 (ns)	0,068 (ns)	0,101 (ns)
Colesterol	-0,242 (0,03)	0,086 (ns)	-0,428 (0,002)	-0,276 (0,019)	0,046 (ns)	-0,359 (0,013)
Hemoglobina	-0,478 (<0,001)	-0,21 (ns)	-0,634 (<0,001)	-0,459 (<0,001)	-0,446 (0,025)	-0,529 (<0,001)
Glucemia	0,066 (ns)	0,026 (ns)	0,145 (ns)	0,344 (0,003)	-0,032 (ns)	0,434 (0,002)
Leucocitos orina	0,178 (0,12)	-0,085 (ns)	0,420 (0,003)	0,173 (0,15)	-0,108 (ns)	0,365 (0,013)
Hematíes orina	0,351 (0,002)	0,115 (ns)	0,538 (<0,001)	-0,007 (ns)	0,017 (ns)	0,02 (ns)
MAU/Cr	0,274 (0,014)	0,177 (ns)	0,307 (0,032)	0,084 (ns)	0,206 (ns)	0,07 (ns)
Pendiente de pérdida de FG	0,064 (ns)	0,182 (ns)	-0,105 (ns)	-0,01 (ns)	0,164 (ns)	-0,195 (ns)

El GDF15 en suero se relaciona de forma directa y estadísticamente significativa con las variables Cr basal, fósforo, hematíes en orina y albuminuria; y de forma indirecta y estadísticamente significativa con el filtrado glomerular basal, albúmina, colesterol y hemoglobina. Cabe destacar que, al hacer el ajuste por sexo, con la excepción del filtrado glomerular solo se objetivó correlación significativa en el sexo masculino. Sin embargo, en la variable leucocitos en orina se objetivó correlación directa y estadísticamente significativa solo en hombres, no en el cómputo total. La no objetivación de correlación significativa en mujeres puede estar relacionado con el menor número de mujeres. No obstante, los valores de las correlaciones fueron en general menores en mujeres, por lo que no podemos descartar que GDF15 refleje mejor la situación renal en varones.

El GDF15 en orina se correlaciona de forma directa y estadísticamente significativa con glucemia. Resulta interesante porque el GDF15 en suero no se relaciona con glucemia. Existe una correlación inversa y estadísticamente significativa entre GDF15 en orina y albúmina, colesterol y hemoglobina, correlaciones que comparte con GDF15 en suero. Cabe destacar que el GDF15 en orina no se relaciona con FG, Cr, hematuria ni albuminuria, que si se relacionan con GDF15 en suero. Ni GDF15 en orina ni en suero se relacionan con la pendiente de pérdida de FG. En la figura 32 se ilustran las diferencias en correlación de valores de GDF15 en suero y orina para una misma variable.

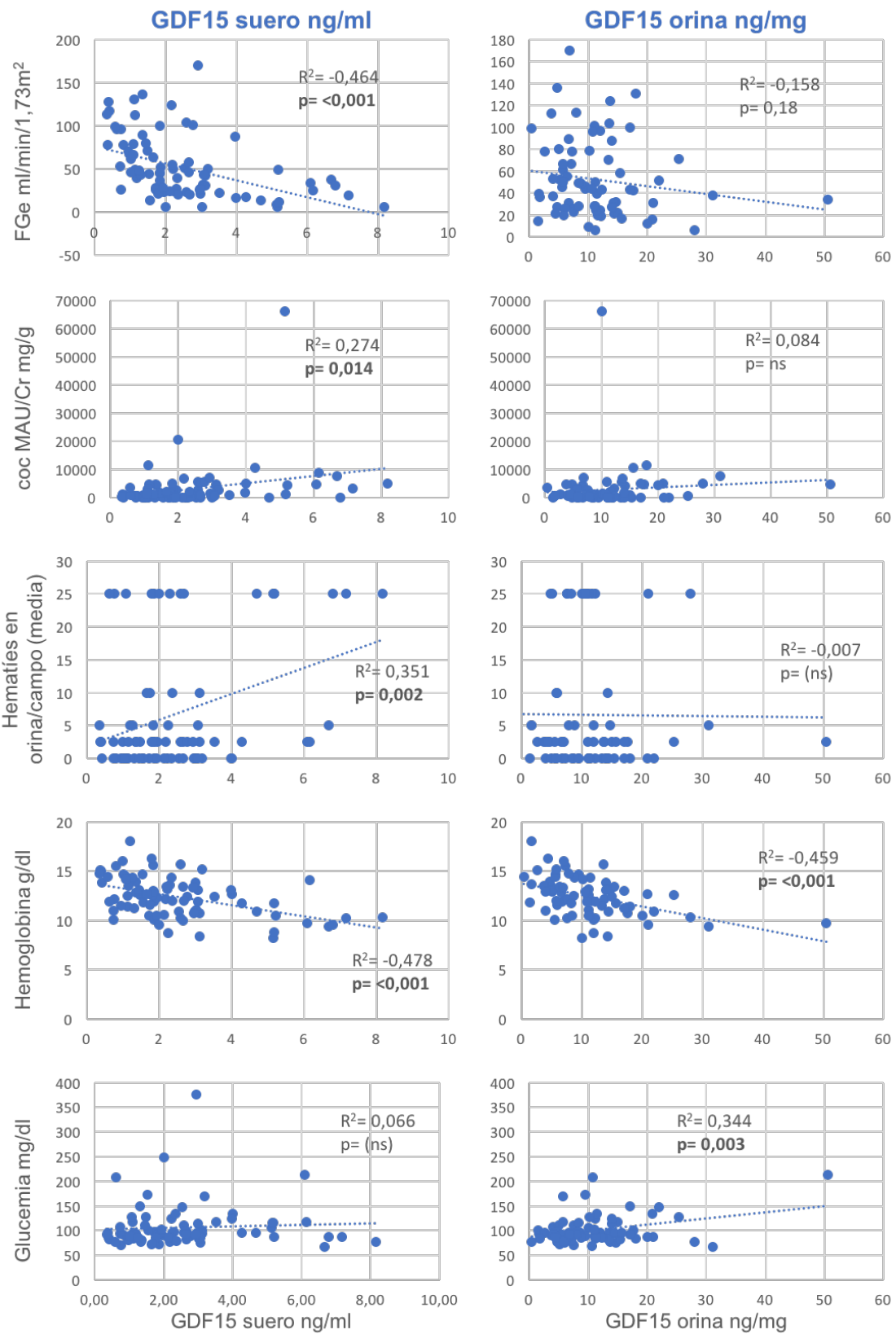


Figura 32 Correlaciones de GDF15 en suero y orina en distintas variables

3.2.10. GDF15 por causa de ERC

Agrupamos las biopsias por causa de ERC y calculamos las medias de valores de GDF15 en los distintos grupos. Los resultados se muestran en la tabla 29.

Tabla 29 GDF15 en suero ng/ml y orina ng/mg según diagnósticos, organizado en orden de frecuencia del diagnóstico. Datos expresados como media \pm desviación estándar (n). Los valores obtenidos de uno o dos pacientes se indican en color gris. Los datos obtenidos de un paciente no tienen desviación estándar por tratarse de un solo valor.

Diagnósticos		GDF15 suero ng/ml	GDF15 orina ng/mg
Grandes categorías	Glomerulonefritis inflamatoria primaria o secundaria	2,8 \pm 2,1 (24)	12,9 \pm 7,3 (21)
	Glomerulonefritis no inflamatoria primaria o secundaria	2,3 \pm 1,5 (32)	10,3 \pm 9,6 (28)
	Nefropatía tubulointersticial crónica	1,9 \pm 0,9 (4)	10,4 \pm 3,2 (4)
	Necrosis tubular aguda	2 (1)	
	ERC sin causa evidente	1,92 (1)	11,07 (1)
	Rechazo de trasplante	2,5 \pm 1,4 (5)	15,2 \pm 8,8 (4)
	Trasplante, otra	2,5 \pm 2 (11)	10 \pm 4,2 (11)
	Otra	2,5 \pm 1,5 (4)	9 \pm 5,6 (4)
Diagnósticos específicos	GSFS	1,8 \pm 0,7 (8)	5 \pm 1,7 (8)
	NIgA	2,5 \pm 2,5 (7)	9,8 \pm 5,6 (7)
	ND	4,1 \pm 1,4 (6)	23,4 \pm 15,7 (5)
	NL III o IV	3,3 \pm 2,9 (5)	14,1 \pm 8,5 (5)
	NM	1,6 \pm 0,3 (5)	7,8 \pm 5,2 (5)
	Nefropatía por depósito	3,1 \pm 2,1 (5)	17,38 \pm 8 (5)
	Rechazo trasplante	2,5 \pm 1,4 (5)	15,2 \pm 8,8 (4)
	Vasculitis	1,5 \pm 1,1 (4)	11,8 \pm 8,9 (3)
	NAE	1,9 \pm 0,8 (4)	8,5 \pm 6,4 (3)
	NL II o V	2 \pm 1,2 (4)	14,1 \pm 3,2 (3)
	NCM	3,6 \pm 2,3 (3)	6,8 (1)
	NTA	2 (1)	
	GN mesangial	0,8 \pm 0,3 (2)	5 \pm 6,4 (2)
	NTIC	1,3 \pm 0,7 (2)	7,8 \pm 0,8 (2)
	Trasplante otros	2,7 \pm 1,9 (11)	10,3 \pm 4,4 (11)
	Otros	2,5 \pm 1,4 (10)	9,9 \pm 3,6 (9)

Al valorar las causas de ERC y los valores medios de GDF15 en suero y orina, llama la atención que el grupo con mayor valor de GDF15 corresponde a la nefropatía diabética. Quisimos explorar si esta diferencia es estadísticamente significativa con respecto al resto de causas de ERC, excluimos los pacientes trasplantados dentro de este análisis, que presentamos en las tablas 30 y 31.

Tabla 30 GDF15 en suero en pacientes con riñones nativos (no trasplantados) con nefropatía diabética versus con otros diagnósticos diferentes de nefropatía diabética

	GDF15 suero ng/ml	p
ND, no trasplante	4,6 ± 1,4	0,009
No ND, no trasplante	2,3 ± 1,6	

Tabla 31 GDF15 en orina en pacientes con riñones nativos (no trasplantados) con nefropatía diabética versus con otros diagnósticos diferentes de nefropatía diabética

	GDF15 orina ng/mg	p
ND, no trasplante	30,5 ± 17,4	0,003
No ND, no trasplante	9,7 ± 6	

El GDF15 está significativamente aumentado en nefropatía diabética de pacientes con riñones nativos en comparación con otros diagnósticos. Seleccionamos a los pacientes con diagnóstico de diabetes que fueron diagnosticados de nefropatía diabética y los comparamos con pacientes biopsiados, con diagnóstico de diabetes sin nefropatía diabética en la biopsia. Excluimos pacientes con trasplante renal. Los resultados los mostramos en las tablas 32 y 33.

Tabla 32 GDF15 en suero en pacientes con diabetes y nefropatía diabética versus pacientes con diabetes sin nefropatía diabética

	GDF15 suero ng/ml	p
DM con ND	4,6 ± 1,4	0,109
DM sin ND	2,9 ± 1,2	

Tabla 33 GDF15 en orina en pacientes con diabetes y nefropatía diabética versus pacientes con diabetes sin nefropatía diabética

	GDF15 orina ng/mg	p
DM con ND	30,5 ± 17,4	0,024
DM sin ND	9,4 ± 5,4	

Existe diferencia al 95% ($p = 0,024$) en GDF15 en orina en pacientes con diabetes y diagnóstico de nefropatía diabética en comparación con pacientes con diabetes sin diagnóstico de nefropatía diabética, lo representamos en la figura 33. En GDF15 en suero esta diferencia no es estadísticamente significativa.

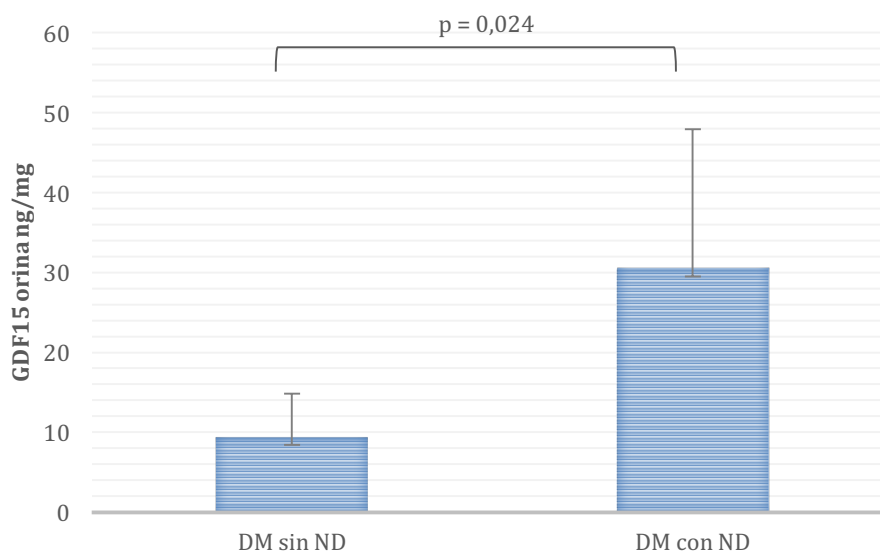


Figura 33 GDF15 en orina de pacientes diabéticos con riñón nativo, con y sin nefropatía diabética

Nos preguntamos si en la nefritis lúpica, otra patología inflamatoria que en modelos experimentales demostramos aumento de GDF15, también presentaba diferencias con el resto de diagnósticos. Al tener similar valor medio de GDF15 tanto en suero como en orina los subgrupos de nefritis lúpica II y V, y nefritis lúpica III y IV, hicimos solo un grupo de nefritis lúpica y comparamos con el resto de pacientes. Excluimos los trasplantados renales. Resultados presentados en las tablas 34 y 35. No objetivamos diferencias entre pacientes con ERC y nefritis lúpica y otros pacientes con ERC.

Tabla 34 GDF15 en suero en pacientes con riñones nativos (no trasplantados) con nefritis lúpica versus con otros diagnósticos diferentes de nefritis lúpica

	GDF15 suero ng/ml	p
NL, no trasplante	1,8 ± 1,1	ns
No NL, no trasplante	2,5 ± 17	

Tabla 35 GDF15 en orina en pacientes con riñones nativos (no trasplantados) con nefritis lúpica versus con otros diagnósticos diferentes de nefritis lúpica

	GDF15 orina ng/mg	p
NL, no trasplante	11,4 ± 4,4	ns
No NL, no trasplante	11 ± 8,9	

3.2.11. Modelos multivariantes para predicción de valores de GDF15 en suero y orina

Para contestar la pregunta ¿qué variables basales pueden predecir los valores de GDF15 en suero u orina?, hemos realizado árboles de clasificación o decisión, tanto para GDF15 en suero como en orina, que están representados en las figuras 34 y 35. Estos árboles parten de un Nodo 0 o raíz, donde se encuentran todos los pacientes, y a medida que se desplaza se va ramificando en subconjuntos o nodos, que se excluyen mutuamente, en cada nodo hay una predicción del valor de la variable dependiente o variable buscada, en función de los valores de las variables independientes.

Para el árbol de clasificación de GDF15 en suero, nuestra variable dependiente es GDF15 en suero y entre las variables independientes incluimos: Cr basal, FGe basal, albúmina, fósforo, colesterol, Hb, glucemia, leucocitos en orina, hematíes en orina, albuminuria, edad, sexo y pendiente pérdida de FG. Según resultados del estudio estadístico, las únicas variables que pueden predecir resultados de GDF15 en suero son: Hb, glucemia y Cr basal (figura 34). La glucemia basal permite estratificar al GDF15 en suero entre los pacientes con $Hb \leq 10,5$ g/dl. El Cr basal permite al GDF15 en suero estratificar los pacientes con $Hb 10,5 - 14,2$ g/dl.

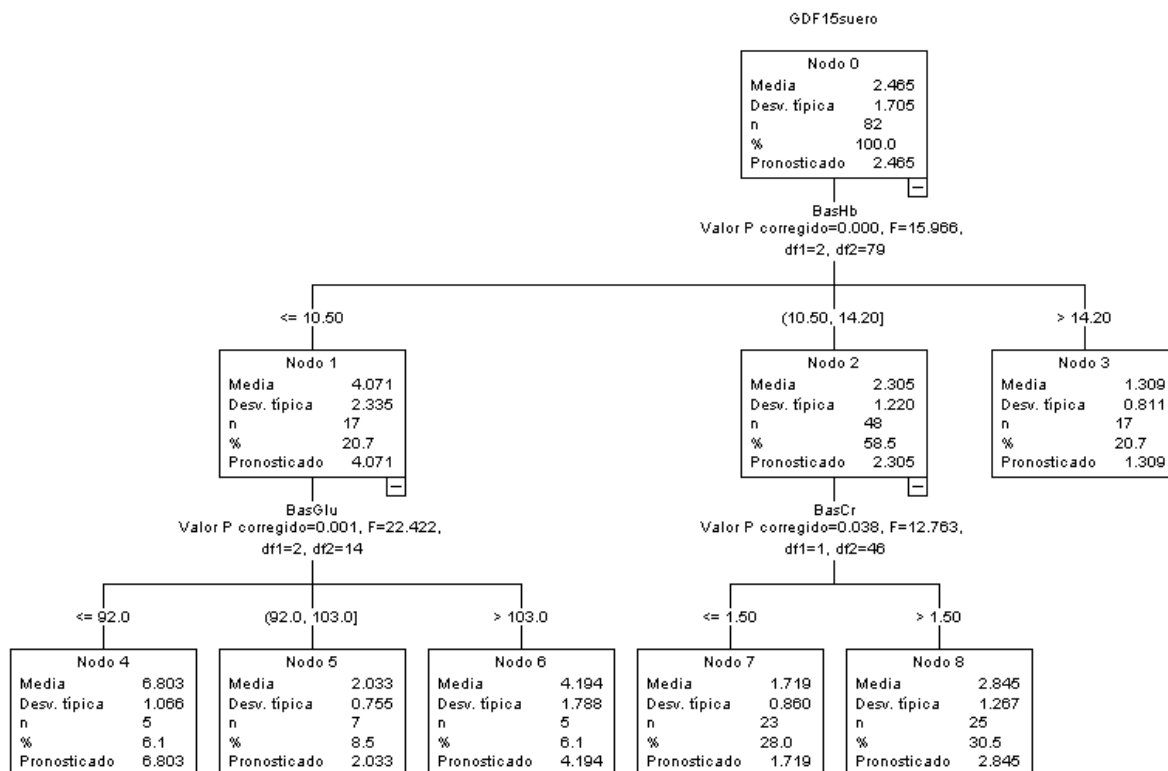


Figura 34 Árbol de clasificación de GDF15 en suero

Según el árbol de clasificación de GDF15 en suero, si un paciente tiene Hb <10,5 g/dl y una glucemia < 92 mg/dl, podría esperar que su GDF15 en suero fuese de media 6,8 ng/ml, un valor elevado. De esta manera se podría “predecir” el valor de GDF15 en suero.

Realizamos el mismo ejercicio con GDF15 en orina. En este caso la variable dependiente es GDF15 en orina y en las variables independientes incluimos: Cr basal, FGe basal, albúmina, fósforo, colesterol, Hb, glucemia, leucocitos en orina, hematíes en orina, albuminuria, edad, sexo y pendiente pérdida de FG. Según resultados del estudio estadístico, las únicas variables que pueden predecir resultados de GDF15 en orina son: Hb, edad y sexo (figura 35).

En el caso del árbol de clasificación del GDF15 en orina, es también la Hb la principal variable que predice el valor de GDF15 orina, si la Hb es <9,7 g/dl probablemente la media de GDF15 en orina del paciente será en torno a 23,12 ng/mg.

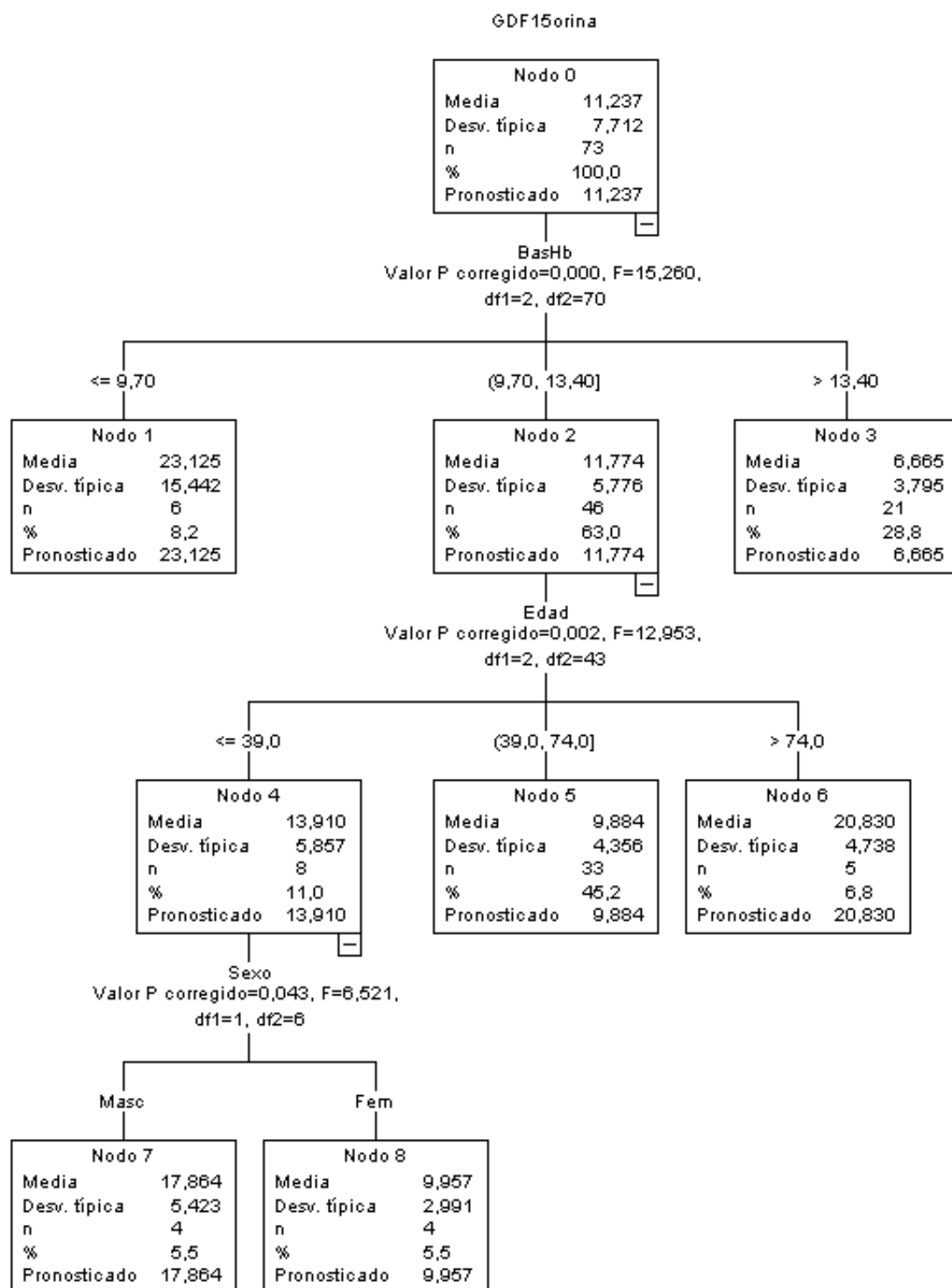


Figura 35 Árbol de clasificación de GDF15 en orina

Los pacientes con Hb 9,7 – 13,4 g/dl pueden ser estratificados, en función de la edad. Dentro de este segundo escalón los pacientes más jóvenes, pueden, a su vez, ser estratificados en función del sexo.

Realizamos el mismo modelo de árboles de clasificación para determinar si los valores de GDF15 en suero u orina pueden predecir hallazgos en la biopsia. Se hicieron varios árboles uno para cada variable dependiente: porcentaje de actividad, porcentaje de glomérulos esclerosados, porcentaje de fibrosis, porcentaje de atrofia, lesiones de GSFS, presencia de semilunas y porcentaje de semilunas; y como variables independientes para cada uno de los árboles se usaron GDF15 en suero y orina. El único árbol que produjo resultado fue el de lesiones de GSFS con la variable independiente GDF15 en orina, es decir que los valores de GDF15 en orina podrían predecir las lesiones de GSFS en la biopsia, en este caso la relación es inversa, a mayor valor de GDF15 en orina se espera menor presencia de lesiones de GSFS en la biopsia.

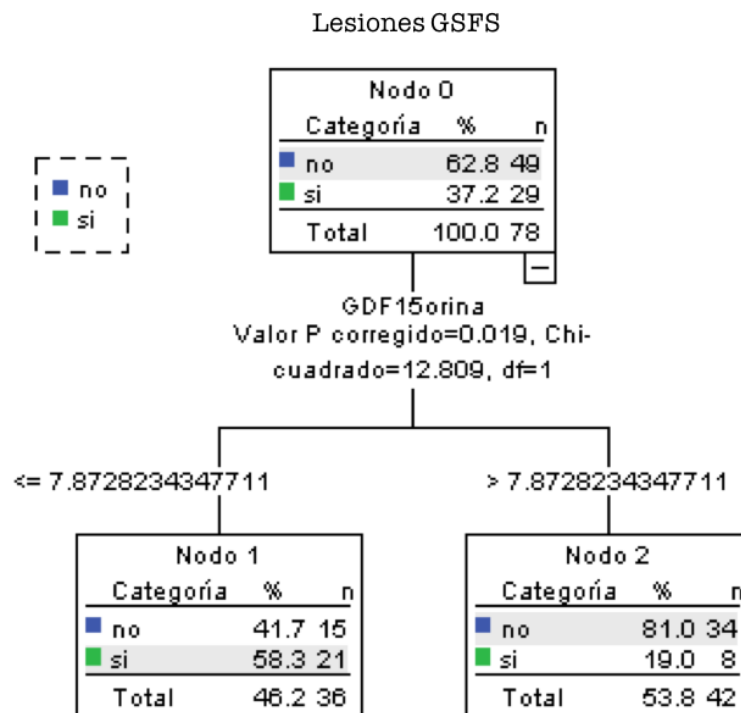


Figura 36 Árbol de clasificación de Lesiones de GSFS con la variable GDF15 orina

Para valorar el aporte de cada una de las variables para predecir los valores de GDF15 en suero y orina, realizamos otro tipo de estudios multivariantes, modelos de regresión lineal, por el que exploramos la relación de las variables y su significación estadística (tablas 36 y 37).

Tabla 36 Identificación de factores predictores de GDF15 sérico mediante regresión lineal. na: no aplica por tener un coeficiente cero. La significación estadística se indica en negritas.

Variable dependiente: GDF15 suero ng/ml		Coefficientes no estandarizados B (error estándar)	p	95% intervalo de confianza	
Variables independientes incluidas	FGe basal	-0,023 (0,004)	<0,001	-0,031	-0,015
	Albúmina	-0,864 (0,17)	<0,001	-1209	-0,519
	Presencia de lesiones de GSFS	-0,659 (0,29)	0,025	-1231	-0,086
	Hematíes en orina	0,066 (0,018)	0,001	0,03	0,103
	Presencia de semilunas	-1481 (0,54)	0,009	-2565	-0,396
Variables independientes excluidas	Edad	0	0,709	na	na
	Cr basal	0	0,542	na	na
	Fósforo	0	0,966	na	na
	Colesterol	0	0,237	na	na
	Hb	0	0,564	na	na
	Glucemia	0	0,253	na	na
	Leucocitos en orina	0	0,753	na	na
	MAU/Cr basal	0	0,872	na	na
	Cr final	0	0,697	na	na
	FG final	0	0,701	na	na
	MAU/Cr final	0	0,462	na	na
	Porcentaje actividad en la biopsia	0	0,084	na	na
	Porcentaje de glomérulos esclerosados	0	0,995	na	na
	Porcentaje de atrofia	0	0,306	na	na
	Porcentaje de fibrosis	0	0,446	na	na
	Porcentaje de semilunas	0	0,755	na	na
	Sexo	0	0,783	na	na
	Riñón nativo	0	0,625	na	na
	HTA	0	0,933	na	na
	DM	0	0,635	na	na

Unidades en las que se han medido las variables: FGe ml/min/1.73 m², albúmina g/dl, lesiones GSFS (si/no), hematíes en orina (media), semilunas (si/no), edad (años), Cr mg/dl, fósforo mg/dl, colesterol total mg/dl, Hb g/dl, glucemia mg/dl, leucocitos en orina (media), MAU/Cr mg/gr, sexo (mas/fem), Riñón nativo/trasplante, HTA si/no, DM si/no.

En el modelo de regresión lineal para predecir GDF15 en suero se determinó que hay 5 variables que determinan de forma estadísticamente significativa los niveles de GDF15 en suero. A mayor: FGe, albúmina, presencia de lesiones de GSFS y presencia de semilunas en la biopsia renal, el GDF15 en suero es menor, porque la relación es inversa. Por otro lado, a mayor presencia de hematíes en orina, mayor GDF15 en suero.

Tabla 37 Identificación de factores predictores de GDF15 en orina mediante regresión lineal. na: no aplica por tener un coeficiente cero. La significación estadística se indica en negritas.

Variable dependiente: GDF15 orina ng/mg		Coefficientes no estandarizados B (error estándar)	p	95% intervalo de confianza	
Variables independientes incluidas	Hb	-4,005 (1,4)	0,006	-6.830	-1.181
	Presencia de lesiones de GSFS	-0.830 (0.32)	0,014	-1.484	-0,176
Variables independientes excluidas	Edad	0	0,791	na	na
	Cr basal	0	0,359	na	na
	FG basal	0	0,14	na	na
	Albúmina	0	0,258	na	na
	Fósforo	0	0,315	na	na
	Colesterol	0	0,542	na	na
	Glucemia	0	0,286	na	na
	Leucocitos en orina	0	0,16	na	na
	Hematíes en orina		0,773		
	MAU/Cr basal	0	0,658	na	na
	Cr final	0	0,204	na	na
	FG final	0	0,537	na	na
	MAU/Cr final	0	0,545	na	na
	Porcentaje actividad	0	0,107	na	na
	Porcentaje de glomerulos esclerosados	0	0,208	na	na
	Porcentaje de atrofia	0	0,144	na	na
	Porcentaje de fibrosis	0	0,248	na	na
	Porcentaje de semilunas	0	0,701	na	na
	Sexo	0	0,986	na	na
	Riñón nativo	0	0,978	na	na
	HTA	0	0,681	na	na
	DM	0	0,136	na	na
	Presencia de semilunas	0	0,576	na	na

Unidades en las que se han medido las variables: Hb g/dl, lesiones GSFS (si/no), edad (años), Cr mg/dl, FGe ml/min/1.73 m², albúmina g/dl, fósforo mg/dl, colesterol total mg/dl, glucemia mg/dl, leucocitos en orina (media), hematíes en orina (media), MAU/Cr mg/gr, sexo (mas/fem), Riñón nativo/trasplante, HTA si/no, DM si/no, semilunas (si/no).

En el modelo de regresión lineal para predecir GDF15 en orina, 2 variables determinan de forma estadísticamente significativa los niveles de GDF15 en orina, a mayor: Hb y presencia de lesiones de GSFS en la biopsia renal, el GDF15 en orina en más bajo.

3.3.Evolución de pacientes

De los 84 pacientes, seguimos a 81. Tres de ellos perdieron contacto con el hospital inmediatamente después de realizarse la biopsia. La media de seguimiento fue 29 ± 17 meses y mediana de 34 meses. En marzo 2017, habíamos perdido seguimiento y desconocemos su estado actual de a 12 (14%) pacientes. Los 72 restantes, 54/72 (75%) estaban vivos, 9 (12,5%) habían fallecido y 9 (12,5%) habían iniciado terapia renal sustitutiva con diálisis (12,5%).

3.3.1. Relación de GDF15 con la evolución

Valoramos si los niveles de GDF15 en suero y orina se relacionan con la evolución y el estado final evaluado como: vivo, diálisis o muerto.

En un primer momento comparamos la relación entre los tres escenarios finales posibles: vivos, muertos o en diálisis entre sí (tabla 38). Existen diferencias estadísticamente significativas al comparar los 3 grupos, tanto para GDF15 en suero como en orina. Para GDF15 en suero, la diferencia significativa existe entre vivos y muertos. Para GDF15 en orina, la diferencia significativa existe entre los grupos muertos y vivos y entre muertos y diálisis.

Tabla 38 Relación de niveles de GDF15 en suero y orina con estado final del paciente. Datos expresados en media \pm DE. La significación estadística se indica en negritas.

	Vivos	Diálisis	Muertos	p
GDF15 suero ng/ml	2,01 \pm 1,31	2,66 \pm 1,81	4,69 \pm 1,94	<0,001
GDF15 orina ng/mg	9,35 \pm 4,42	11,72 \pm 6,99	24,87 \pm 11,94	<0,001

Agrupamos los dos desenlaces desfavorables (muerte + diálisis) y comparamos con vivos, comprobamos que en estos grupos también se ve una diferencia estadísticamente significativa (tabla 39).

Tabla 39 Relación de niveles de GDF15 en suero y orina con estado final del paciente, estado favorable: vivo versus desfavorable: diálisis o muerte. Datos expresados en media \pm DE. La significación estadística se indica en negritas

	Vivos	Muertos o en Diálisis	p
GDF15 suero ng/ml	2,01 \pm 1,31	3,68 \pm 2,1	0,001
GDF15 orina ng/mg	9,35 \pm 4,42	17,91 \pm 11,52	0,001

Nos interesa saber en qué grupos, separados por cuartiles por valores de GDF15 en suero y orina, existe diferencia en la evolución de los pacientes. Se hizo una comparación entre grupos que se muestra en las tablas 40 y 41.

Tabla 40 Evolución de los pacientes agrupados por cuartiles de GDF15 en suero. Los datos están expresados como media \pm desviación estándar o n (%). Los valores estadísticamente significativos se señalan en negrita. ns: no

GDF15 suero ng/ml		Q1 (0,34 – 1,24)	Q2 (1,24 – 1,97)	Q3 (1,97 – 3,02)	Q4 (3,02 – 8,16)	Total	p
Vivos		19/19 (100%)	12/17 (71%)	14/18 (78%)	9/18 (50%)	54/72 (75%)	0,001
Diálisis		0/19 (0%)	5/17 (29%)	2/18 (11%)	2/18 (11%)	9/72 (13%)	
Muertos		0/19 (0%)	0/72 (0%)	2/18 (11%)	7/18 (39%)	9/72 (13%)	
Evolución ERC	Pendiente pérdida de FG	0,17 \pm 1,19	-0,12 \pm 0,57	0,48 \pm 1,87	0,7 \pm 2,78	0,31 \pm 1,6	ns
	Pendiente aumento de MAU	-36 \pm 84	14 \pm 92	-147 \pm 491	- 399 \pm 773	-142 \pm 360	0,049

Unidades: Pendiente de FG ml/min/m²/mes, Pendiente pérdida de MAU mg/gr/mes

Al comparar los grupos de cuartiles de GDF15 en suero, existe una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos (p=0,001). Los pacientes con valores de GDF15 en suero en el Q4 se mueren más de lo esperado de forma significativa y los pacientes con valores en el Q2 entran más a diálisis de lo esperado con respecto a los otros grupos. También existe una diferencia estadísticamente significativa en la pendiente de cambio de MAU. En los pacientes del grupo Q4 la MAU disminuye más con el tiempo que a los del grupo Q2.

Tabla 41 Evolución de los pacientes agrupados por cuartiles de GDF15 en orina. Los datos están expresados como media \pm desviación estándar o n (%). Los valores estadísticamente significativos se señalan en negrita. ns: no

GDF15 orina ng/mg		Q1 (0,41 – 5,85)	Q2 (5,85 – 10,62)	Q3 (10,62 – 14,11)	Q4 (14,11 – 50,52)	Total	p
Vivos		14/16 (88%)	14/15 (93%)	14/18 (78%)	7/17 (41%)	49/66 (74%)	0,002
Diálisis		2/16 (12%)	1/15 (7%)	3/18 (17%)	3/17 (18%)	9/66 (14%)	
Muertos		0/18 (0%)	0/15 (0%)	1/18 (5%)	7/17 (41%)	8/66 (12%)	
Evolución ERC	Pendiente pérdida de FG	-0,02 \pm 0,61	0,48 \pm 1,05	-0,18 \pm 0,98	0,37 \pm 2,77	0,16 \pm 1,35	ns
	Pendiente aumento de MAU	-7 \pm 104	-136 \pm 377	27 \pm 174	-301 \pm 671	-104 \pm 332	ns

Unidades: Pendiente de FG ml/min/m²/mes, Pendiente pérdida de MAU mg/gr/mes

Al comparar los grupos de cuartiles según el valor de GDF15 en orina existe una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos ($p=0,002$). Los pacientes con valores de GDF15 en orina en el Q4 se mueren más de lo esperado de forma significativa con respecto a los otros grupos. No se objetivó diferencia en la evolución de la función renal y los valores de GDF15.

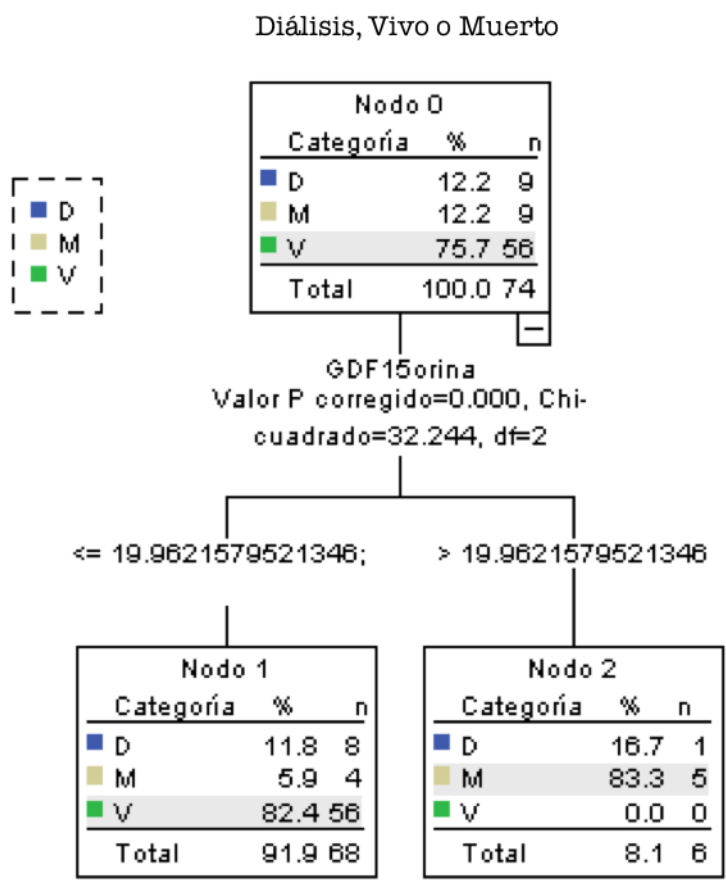
3.3.2. GDF15 como predictor de la evolución: estudios multivariantes.

Realizamos árboles de clasificación para valorar si los valores de GDF15 en suero y orina pueden predecir la evolución de los pacientes: muerte, diálisis o vivos, o si se relacionan con la pendiente de pérdida de FG.

Realizamos 3 árboles de clasificación, el primero con la variable dependiente: “Vivo o Diálisis o Muerto”; el segundo como variable dependiente: “Vivo o Diálisis + Muerte” y un tercero con la variable dependiente pérdida de filtrado glomerular.

Para el árbol de clasificación de variable dependiente: “Vivo o Diálisis o Muerte”, en las variables independientes incluimos: GDF15 suero, GDF15 orina, GDF15 suero*orina, GDF15 suero/orina, Sexo, Edad, FG basal, MAU/Cr basal. La única variable que predice

evolución de los pacientes es el valor de GDF15 en orina, que si es mayor de 19,9 ng/mg se asocia a aumento de mortalidad: mortalidad 83% (figura 37).



<= 19.9621579521346;

Nodo 1		
Categoría	%	n
D	11.8	8
M	5.9	4
V	82.4	56
Total	91.9	68

> 19.9621579521346

Nodo 2		
Categoría	%	n
D	16.7	1
M	83.3	5
V	0.0	0
Total	8.1	6

Figura 37 Árbol de clasificación de evolución de los pacientes: diálisis, vivo o muerto.

Para el árbol de clasificación de variable dependiente: “Vivo o Diálisis + Muerte”, en las variables independientes incluimos: GDF15 suero, GDF15 orina, GDF15 suero*orina, GDF15 suero/orina, Sexo, Edad, FG basal, MAU/Cr basal. Las únicas variables que predicen evolución de los pacientes son: GDF15 en orina y FG basal. El GDF15 en orina mayor de 19,9 ng/mg se asocia a aumento de mortalidad (figura 38).

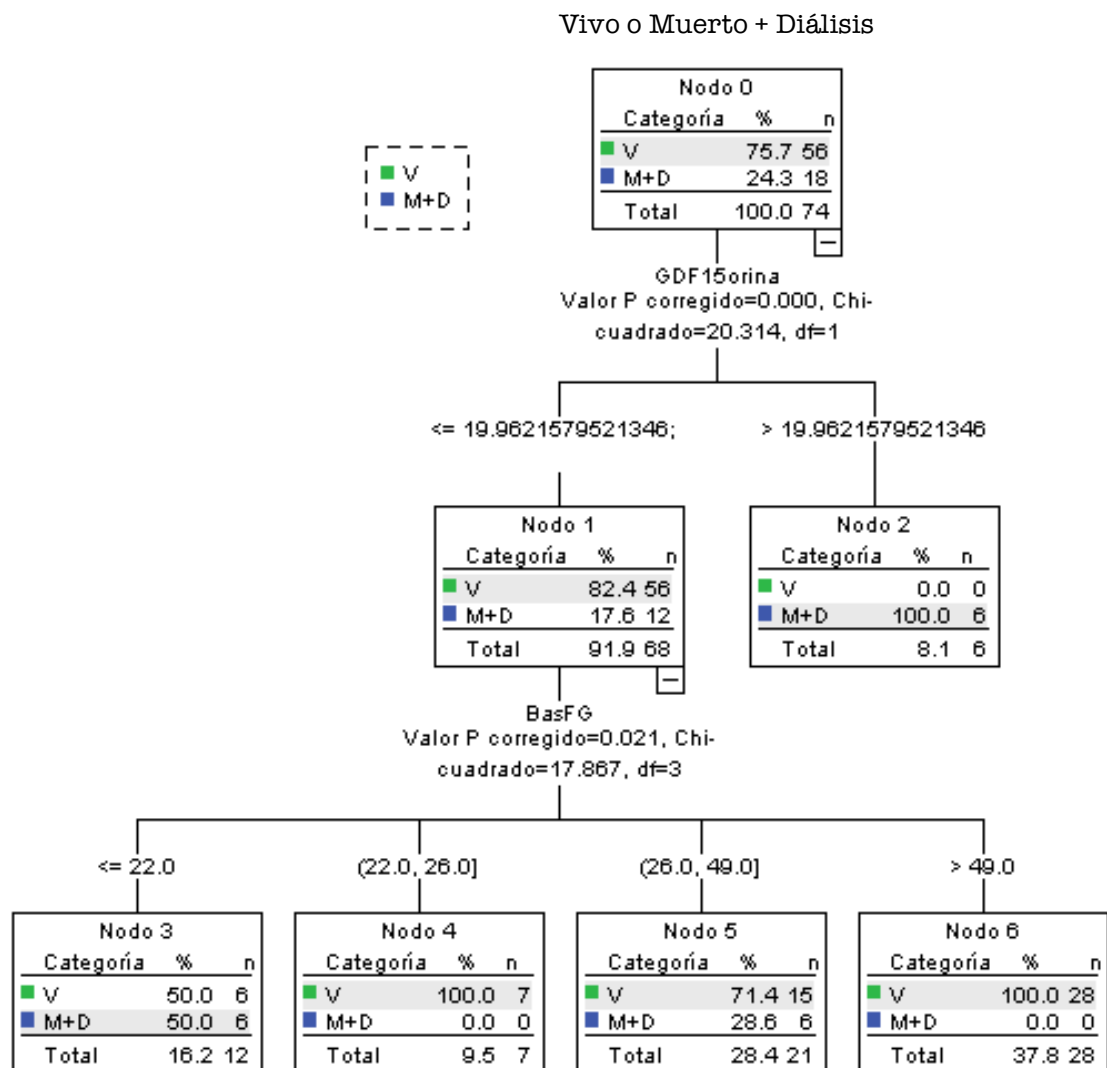


Figura 38 Árbol de clasificación de evolución de los pacientes: vivo o (muerto + diálisis).

Para el árbol de clasificación de variable dependiente pendiente de pérdida del FG, en las variables independientes incluimos: GDF15 suero, GDF15orina, GDF15 suero*orina, GDF15 suero/orina, Sexo, Edad, FG basal, MAU/Cr basal. Ninguna de estas variables predice la pendiente de pérdida de FG.

Para valorar el aporte de cada una de las variables sobre la evolución de los pacientes, realizamos modelos de regresión logística, en los que exploramos la relación de las variables independientes y su significación estadística para predecir la evolución (vivo, muerto o diálisis). Para realizar estos análisis separamos los pacientes vivos de los muertos, incluyendo en los vivos los que están en diálisis, y separamos GDF15 en suero

y orina en las variables independientes, ya que los modelos multivariantes podrían excluir la relación de alguno de las dos variables, al ser una más fuerte que la otra e indicar la misma relación con la variable dependiente (tabla 42).

- Variable dependiente: vivos (vivo + diálisis), estudiando como variables independientes, GDF15 en suero, edad, sexo, FG basal y MAU/Cr. En este modelo resultan significativas las variables GDF15 en suero y edad para predecir supervivencia. Al ser un valor negativo es inverso, a mayor GDF15 en suero y mayor edad, menor probabilidad de estar vivo (incluido vivo + diálisis).
- Variable dependiente: vivos (vivo + diálisis), estudiando como variables independientes, GDF15 en orina, edad, sexo, FG basal y MAU/Cr. En este modelo resulta significativa la variable GDF15 en orina. Al ser un valor negativo es inverso, a mayor GDF15 en orina y mayor edad, menor probabilidad de estar vivo (incluido vivo + diálisis). El modelo estadístico también ha incluido la edad como variable independiente al tener relación con la variable dependiente, pero el valor de p no es estadísticamente significativo.
- Variable dependiente: muertos + diálisis, estudiando como variables independientes, GDF15 en suero, edad, sexo, FG basal y MAU/Cr. En este modelo resultan significativa solo la variable GDF15 en suero, a mayor GDF15 en suero, mayor probabilidad de estar muerto o en diálisis.
- Variable dependiente: muertos + diálisis, estudiando como variables independientes, GDF15 en orina, sexo, FG basal y MAU/Cr. En este modelo resultan significativas las variables GDF15 en orina y FG para predecir la variable dependiente. A mayor GDF15 en orina, mayor probabilidad de estar muerto o en diálisis. A menor FG basal mayor probabilidad de estar muerto o en diálisis.

Tabla 42 Modelos de regresión logística para predecir evolución: muerte, diálisis o vivo, valoradas por separado las variables GDF15 en suero y orina. La significación estadística se señala en negrita.

Variables		Coefficientes no estandarizados B (error estándar)	p
Variable dependiente: vivos (vivo + diálisis)			
Variables independientes incluidas	Edad	-0,154 (0,06)	0,01
	GDF15 suero	-1,001 (0,375)	0,008
Variables independientes excluidas	Sexo	0	0,05
	FG basal	0	0,741
	MAU/Cr basal	0	0,518
Variable dependiente: vivos (vivo + diálisis)			
Variables independientes incluidas	Edad	-0,142 (0,078)	0,069
	GDF15 orina	-0,395 (0,182)	0,03
Variables independientes excluidas	Sexo	0	0,085
	FG basal	0	0,274
	MAU/Cr basal	0	0,070
Variable dependiente: muerte + diálisis			
Variables independientes incluidas	GDF15 suero	0,547 (0,183)	0,003
Variables independientes excluidas	Edad	0	0,362
	Sexo	0	0,155
	FG basal	0	0,062
	MAU/Cr basal	0	0,111
Variable dependiente: muerte + diálisis			
Variables independientes incluidas	FG basal	-0,043 (0,18)	0,015
	GDF15 orina	0,203 (0,71)	0,004
Variables independientes excluidas	Edad	0	0,071
	Sexo	0	0,333
	MAU/Cr basal	0	0,243

Unidades en las que fueron medidas las variables: GDF15 suero ng/ml, GDF15 orina ng/ml, Edad (años), Sexo (mas/fem), MAU/Cr mg/gr, FG ml/min/1,73m².

En los modelos multivariantes que hemos realizado hasta ahora, árboles de clasificación y regresión logística, se aprecia en ambos una relación de GDF15 en orina con mortalidad y mortalidad + diálisis. En relación al GDF15 en suero, solo apreciamos relación con mortalidad y mortalidad + diálisis en el modelo de regresión logística, esto podría deberse a que en este último el GDF15 en suero no fue incluido en las variables independientes al mismo tiempo que el GDF15 en orina, como en los modelos de árboles de clasificación. Esto puede indicar que la relación con mortalidad y mortalidad + diálisis es más fuerte con los niveles de GDF15 en orina y el modelo lo excluyó. Para demostrar esto realizamos dos modelos multivariantes adicionales en los que

incluimos a la vez como variables independientes: GDF15 en suero, GDF15 en orina y edad (tabla 43). En estos modelos se aprecia como GDF15 en suero queda excluido al ser comparado con GDF15 en orina como predictor de mortalidad.

Tabla 43 Modelos de regresión logística para predecir evolución: muerte, diálisis o vivo, valoradas a la vez las variables GDF15 en suero y orina. La significación estadística se señala en negrita.

Variables		Coefficientes no estandarizados B (error estándar)	p
Variable dependiente: vivos (vivo + diálisis)			
Variables independientes incluidas	GDF15 orina	-0,395 (0,182)	0,03
	Edad	-0,141 (0,78)	0,07
Variables independientes excluidas	GDF15 suero	0	0,814
Variable dependiente: muerto + diálisis			
Variables independientes incluidas	GDF15 orina	0,191 (0,06)	0,002
Variables independientes excluidas	GDF15 suero	0	0,130
	Edad	0	0,217

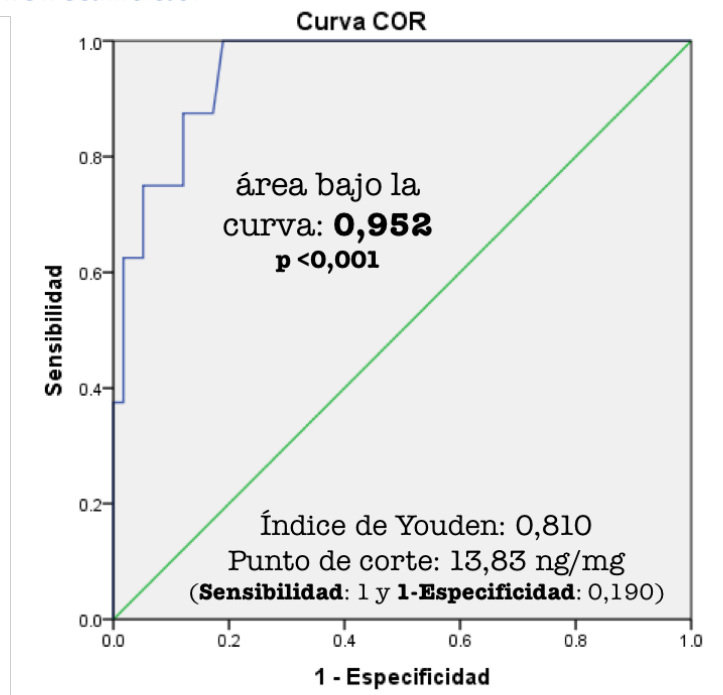
Unidades en las que fueron medidas las variables: GDF15 suero ng/ml, GDF15 orina ng/ml, Edad (años).

Dada esta relación importante entre GDF15 en orina y los eventos no deseados como son mortalidad y diálisis, hemos realizado unas curvas ROC para representar gráficamente la sensibilidad y especificidad que tiene GDF15 en orina para predecir el estado final del paciente: muerte, diálisis o muerte + diálisis (figura 39). Las curvas ROC obtenidas indican que GDF15 tiene un buen índice de calidad diagnóstica para predecir mortalidad, con un área bajo la curva (AUC) de 0,952 (IC 95% 0,9-1; $p < 0,001$). Se utilizó el índice de Youden para decidir el valor de corte que maximice la diferencia entre sensibilidad y (1 – especificidad). Mediante este índice se determinó el punto de corte: GDF15 en orina 13,83 ng/mg. Lo que indica que el test es positivo si el valor es superior de 13,83 ng/mg con una sensibilidad de 100% y especificidad de 81%. Los valores de área bajo la curva son menores para predecir mortalidad + diálisis: AUC 0,777 (IC 95% 0,6-0,9; $p = 0,001$) y no fue significativo para predecir diálisis por separado: AUC 0,541 (IC 95% 0,3-0,7; $p = 0,695$).

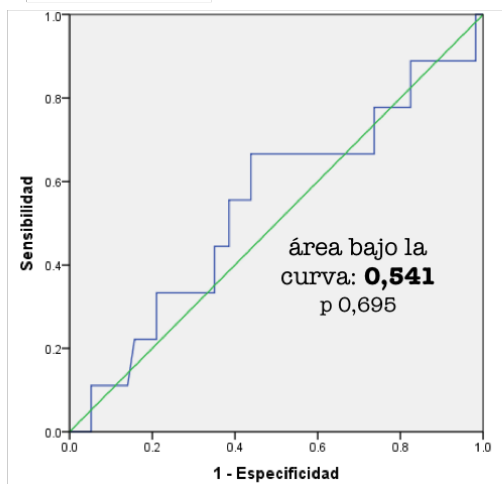
Curvas ROC

GDF15 orina, sensibilidad y especificidad para:

Mortalidad

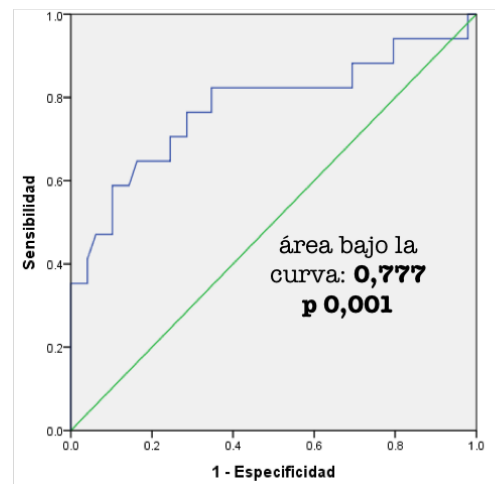


Diálisis



Índice de Youden: 0,228
Punto de corte: 11,14 ng/mg
(Sensibilidad: 0,661 y 1-Especificidad: 0,439)

Muerte + Diálisis



Índice de Youden: 0,486
Punto de corte: 14,52 ng/mg
(Sensibilidad: 0,588 y 1-Especificidad: 0,102)

Figura 39 Curva ROC de GDF15 en orina, mortalidad, diálisis y muerte + diálisis.

3.4. Expresión de GDF15 en biopsias renales

Finalmente, realizamos tinción con inmunohistoquímica en 10 pacientes, a fin de evaluar que si la expresión de proteína GDF15 esta aumentada en el tejido renal, qué células la expresan y su posible relación con el GDF15 sérico o en orina. Teníamos 32 muestras de parafina, seleccionamos 10, 5 con los valores más bajos de GDF15 en orina (<7 ng/mg) y 5 con los valores más altos (>18 ng/mg). Se compararon las muestras de pacientes con un paciente control, procedente de muestra de nefrectomía del biobanco, con tejido renal relativamente conservado.

Mediante inmunohistoquímica comprobamos que la tinción para GDF15 es fundamentalmente tubular (figura 40). Así mismo, se observaron células infiltrantes intersticiales teñidas, que, aunque no ha sido caracterizadas formalmente, pensamos que son leucocitos. En los glomérulos la tinción es escasa. Se observan ocasionales células glomerulares individuales débilmente teñidas.

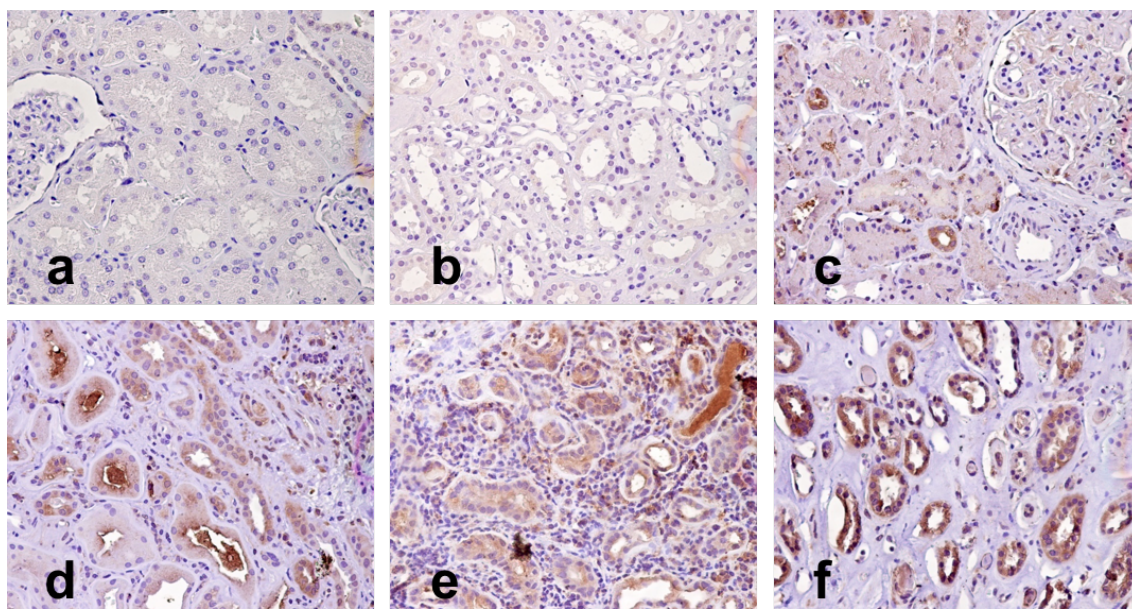


Figura 40 Determinación de GDF15 mediante inmunohistoquímica en biopsias renales. a: control. b y c: paciente con GDF15 urinario bajo, en c algún tubillo teñido con GDF15. d, e y f: paciente con GDF15 urinario alto, en d depósitos intratubulares de la tinción, e expresión de GDF15 en células infiltrantes.

La inclusión de muestras con GDF15 urinario alto y bajo permitió tener una idea inicial de la posible relación entre GDF15 urinario y tinción renal para GDF15. Se cuantificó la tinción de GDF15 mediante un software de puntuación cuantitativa, la media \pm DE del porcentaje de área teñida en las muestras con GDF15 urinario alto fue $8,6 \pm 2,4$ % y en las de muestras con GDF15 urinario bajos fue $3,5 \pm 2,8$ ($p < 0,014$). Además, existe una correlación positiva entre valores de GDF15 urinarios y porcentaje de área teñida (figura 41). Sin que los datos puedan considerarse definitivos dado el pequeño número de muestras, parece que en los riñones correspondientes con alto GDF15 urinario existió más tinción tubular e incluso se visualizaba tinción en la luz tubular, que podría corresponder al GDF15 detectable en orina.

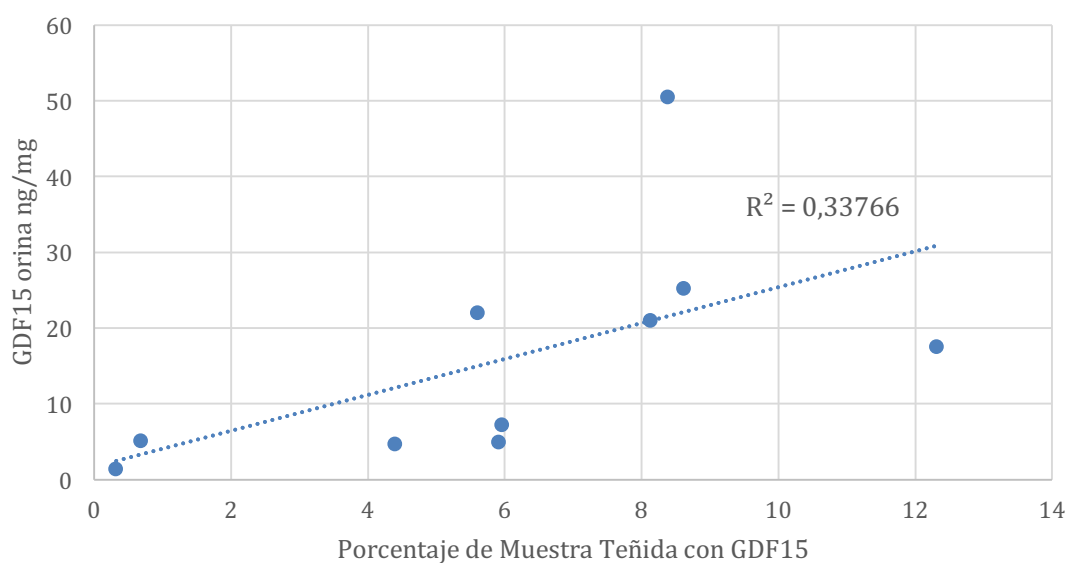


Figura 41 Correlación entre valores de GDF15 urinarios ng/mg y porcentaje de muestra teñida de GDF15 en biopsias renales.

Discusión

Los principales resultados de esta tesis son

1. La expresión renal de GDF15 esta aumentada en nefropatías glomerulares y tubulointersticiales experimentales y humanas.
2. En pacientes con nefropatías biopsiados están aumentadas las concentraciones urinarias y séricas de GDF15.
3. La concentración de GDF15 sérica aumenta al disminuir el FG
4. Los valores de GDF15 urinario podrían contribuir a diferenciar la causa del daño renal en pacientes diabéticos.
5. Los niveles séricos y urinarios de GDF15 identifican pacientes con un alto riesgo de muerte. En un análisis multivariable, el GDF15 urinario tuvo mayor poder predictivo de muerte que el GDF15 sérico.

1. Expresión renal de GDF15 en nefropatías experimentales y humanas

En animales de experimentación objetivamos aumento de expresión génica GDF15 en riñón total en los modelos de fracaso renal agudo y nefropatía lúpica; y en los glomérulos en el modelo de daño renal por proteinuria con respecto a controles. Estos datos son novedosos porque a nivel experimental hasta ahora solo se ha descrito aumento de GDF15 en tejido renal en ciertos modelos de daño renal: nefrectomía parcial, isquemia-reperfusión y administración de tetracloruro de carbono (67). En ese sentido, nuestros datos amplían el espectro de nefropatías experimentales con aumento de GDF15 a patologías tubulointersticiales como FRA y nefropatías glomerulares de causa inmune como lupus o no inmune como el modelo de proteinuria por administración exógena de albúmina de suero bovino.

Sin embargo, a pesar de que en el daño renal tubulointersticial y glomerular (inmune y no inmune) GDF15 esta aumentado, en el modelo experimental de inflamación mediante administración exógena de Tweak, GDF15 disminuye. Esto podría explicarse porque durante el daño renal existen cambios en la expresión génica que son el

resultado final integrado de la respuesta a múltiples procesos como muerte celular, inflamación, entre otros; y mediadores, algunos lesivos, otros protectores que aumentan de forma compensadora para intentar limitar el daño (93). En estos momentos no se conoce bien qué factores aumentan la expresión de GDF15 en el daño renal. Una posibilidad es que sea una respuesta a citoquinas pro-inflamatorias como Tweak. No obstante, la administración sistémica de Tweak no solo no aumentó, sino que disminuyó la expresión renal de GDF15. En base a estos datos hipotetizamos que quizá el aumento de GDF15 se produce en respuesta a factores nefroprotectores que se producen durante el daño renal (figura 41).

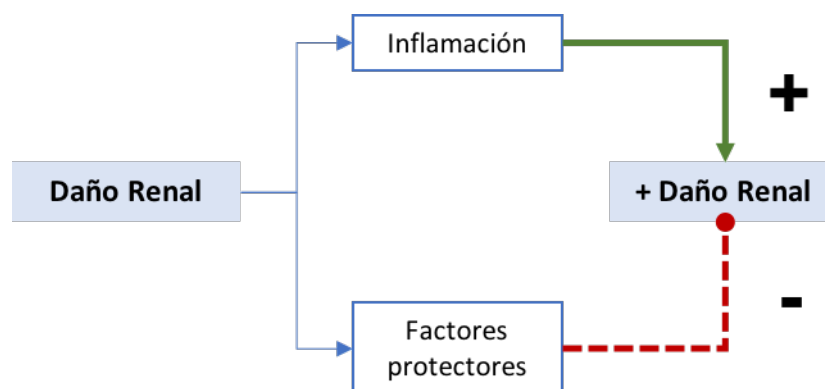


Figura 42 Esquema de Daño Renal. El daño inicial del riñón desencadena dos tipos de respuestas: una respuesta inflamatoria, que amplifica el daño renal; y una respuesta adaptativa que tiende a proteger del daño renal. En base a los resultados obtenidos, hipotetizamos que el aumento de expresión de GDF15 durante el daño renal puede depender de esta respuesta adaptativa

Por otro lado, en este estudio hemos analizado bases transcriptómicas realizadas por otros investigadores. Existen múltiples estudios transcriptómicos publicados y accesibles online de múltiples tejidos y enfermedades. Se podría pensar que, al no tratarse de información generada por nosotros mismos, es información que no se puede analizar o no se debe utilizar para generar nuevos datos, sin embargo, estas bases de datos corresponden a publicaciones que se han fijado solo en algún aspecto de la información obtenida de los datos. Así, algunos estudios han identificado vías moleculares activadas, otros, factores de transcripción implicados, y otros, el o los genes que más incrementan su expresión. Sin embargo, un estudio transcriptómico analiza la expresión diferencial de más de 20.000 genes y esta información está

“enterrada” en las bases de datos online y en los datos suplementarios de las publicaciones. Es necesario que haya investigaciones que se encarguen de hacer minería de datos, data mining, extrayendo, analizando e integrando esta información y presentándola de una forma coherente y comprensible, poniéndola en contexto fisiopatológico y clínico.

En las bases de datos transcriptómicas, en estudios experimentales, hemos objetivado que la expresión de GDF15 se encuentra aumentada en glomérulos de ratones con nefropatía diabética y en riñón total en ratones con nefritis lúpica, existiendo además en esta última mayor expresión de GDF15 en ratones con proteinuria en comparación con no proteinuria, resultado similar al modelo experimental nuestro de nefritis lúpica.

En humanos, en bases de datos transcriptómicas de riñón total en pacientes sin ERC, identificamos que la mayor expresión de GDF15 se encuentra en condiciones normales en médula y papila renal, siendo expresada en menor medida en los glomérulos. En pacientes con diversas causas de ERC, la expresión de GDF15 fue más alta que en riñones de controles. En glomérulos de riñones humanos, hemos objetivado que la expresión renal de GDF15 está aumentada en nefropatías como GSFS, GSFS colapsante, nefropatía diabética y nefritis lúpica; y además dentro de nefritis lúpica, existe mayor expresión de GDF15 en nefritis lúpica clase IV en comparación con pacientes con enfermedad menos grave, nefritis lúpica clase II y III. En tubulointersticio de riñones humanos, la expresión renal de GDF15 está aumentada en GSFS, en NlgA y nefritis lúpica con proteinuria nefrótica en comparación con NlgA y nefritis lúpica con proteinuria no nefrótica; y al igual que en glomérulos existe aumento de GDF15 en nefritis lúpica clase IV en comparación con pacientes con enfermedad menos grave, nefritis lúpica clase II. Los datos clínicos complementan los datos preclínicos y destacamos que ambos análisis coinciden en la mayor expresión de GDF15 en nefropatía diabética y nefritis lúpica. Estos datos, como discutimos más adelante, son acordes a los hallazgos de GDF15 urinario.

Cabe destacar que en bases de datos transcriptómicas humanas, no se observan diferencias entre NlgA y nefropatía membranosa ni en glomérulo ni en túbulointersticio comparadas con controles. Una explicación podría ser que las diferencias existen, pero no las objetivamos. En los datos se puede ver que la diferencia entre pacientes y controles aparenta ser entre 2 y 3 veces, lo cual para otras nefropatías era significativo. Sin embargo, estadísticamente no se observaron diferencias. Esto podría deberse a la heterogeneidad de la muestra o sus controles. En el caso de túbulointersticio para nefropatía membranosa, la ausencia de diferencia significativa pudo también deberse al hecho de que el control era otra nefropatía proteinúrica (nefropatía de cambios mínimos). En cualquier caso, tanto la NlgA como la nefropatía membranosa son dos enfermedades glomerulares relativamente poco inflamatorias. En el caso de la NlgA puede asociarse a proteinurias patológicas, pero relativamente bajas. Ambos hechos pueden condicionar una menor lesión estructural glomerular y tubulointersticial. En este sentido, la historia natural de la NlgA suele ser de décadas, lo cual da idea de la poca agresividad de la enfermedad. Por otra parte, la nefropatía membranosa tiene una evolución variable, aproximadamente un tercio de los pacientes remiten espontáneamente, un tercio evoluciona a ERC no terminal y un tercio evoluciona a diálisis. Es precisamente esta heterogeneidad la que puede haber limitado la capacidad de ver diferencias estadísticamente significativas.

2. En pacientes con nefropatías biopsiados están aumentadas las concentraciones urinarias y séricas de GDF15.

Hemos objetivado un aumento de los niveles de GDF15 sérico y urinario en pacientes con ERC biopsiados. Existen relativamente pocos datos sobre los niveles séricos y urinarios de GDF15 en pacientes con ERC. Los niveles de GDF15 séricos habían sido medidos previamente en pacientes con ERC en pocos estudios. En 2017, en un trabajo que cuando escribimos estas líneas estaba publicado únicamente online, se observó que en pacientes con ERC los niveles de GDF15 séricos se correlacionaban con los niveles de RAM de GDF15 en biopsias renales (68). En pacientes en hemodiálisis

también se objetivaron niveles altos de GDF15 sérico (71). Nuestros datos confirman pues el aumento de los niveles séricos de GDF15 en diversas nefropatías. Además, hemos obtenido información adicional. Así, hemos objetivado que factores se relacionan con los niveles basales de GDF15. Llamativamente los niveles séricos de GDF15 se relacionan con una serie de variables asociadas por si mismas con un mayor riesgo de mortalidad. En los árboles de clasificación, los pacientes con Hb más baja tuvieron GDF15 sérico más elevado y esto fue especialmente llamativo en los diabéticos. Otros factores predictivos de los niveles de GDF15 séricos, objetivados en los modelos multivariantes de regresión lineal, fueron los valores de FG y albuminemia. Los niveles de GDF15 en suero también fueron más altos a mayor albuminuria. Sin embargo, la albuminuria no resultó ser un predictor de GDF15 en suero en el análisis multivariable, probablemente porque la albuminuria también es mayor en pacientes con menor FG. Así mismo, características de la biopsia, presencia de lesiones de GSFS o semilunas, o de la orina (hematuria) también contribuyen a predecir los valores de GDF15 séricos.

Por primera vez hemos estudiado los factores predictores de los niveles de GDF15 urinarios. A diferencia del GDF15 sérico, no existió relación con el FG. En concordancia con los datos publicados en ND (73), tampoco existió asociación con la albuminuria. Sin embargo, en un modelo multivariable, una Hb sérica baja o la ausencia de lesiones de GSFS fueron predictores de niveles más altos de GDF15 en orina. El modelo de árbol de decisión identificó también a la edad (niveles más altos de GDF15 en los más ancianos) y el sexo (niveles más altos en varones) como factores predictores de los niveles de GDF15 urinario, especialmente entre los pacientes con valores de Hb entre 9,7-13,4 g/dl.

3. Los valores de GDF15 urinario podrían contribuir a diferenciar la causa del daño renal en pacientes diabéticos.

Cuando analizamos la información que pudieran facilitar los niveles de GDF15 en suero o en orina sobre los diagnósticos de las biopsias, únicamente llamaron la atención

unos niveles de GDF15 sérico y urinario más altos en diabéticos que en pacientes con otras nefropatías. Así, los niveles de GDF15 en suero fueron el doble de altos en pacientes con nefropatía diabética que en pacientes sin nefropatía diabética. Sin embargo, no objetivamos diferencias significativas entre diabéticos con nefropatía diabética y diabéticos sin nefropatía diabética. Más llamativos resultados los valores de GDF15 urinario. Fueron 3 veces más altos en pacientes con nefropatía diabética que en pacientes sin nefropatía diabética (independientemente de que el paciente tuviera diabetes o no). No obstante, la población sin nefropatía diabética fue heterogénea y algunos diagnósticos, como por ejemplo la nefropatía por depósito, el rechazo de trasplante, o la nefritis lúpica, se asociaron a valores más altos de GDF15 urinario que otros diagnósticos. En este sentido, el que un paciente tenga o no nefropatía diabética es una cuestión que únicamente tiene interés en los pacientes diabéticos. Por eso comparamos los niveles de GDF15 urinario entre los pacientes diabéticos con nefropatía diabética y los pacientes diabéticos sin nefropatía diabética: los pacientes diabéticos con nefropatía diabética tuvieron niveles de GDF15 urinario 3 veces más altos. El escaso número de muestras limita nuestra capacidad para sacar conclusiones definitivas sobre el valor predictivo y, por lo tanto, la utilidad clínica de la determinación de GDF15 en orina, para apoyar o descartar la existencia de nefropatía diabética sin realizar biopsia renal. No obstante, estos llamativos resultados sugieren que se deben realizar estudios prospectivos en este sentido.

4. Los niveles séricos y urinarios de GDF15 identifican pacientes con un alto riesgo de muerte.

Existen muy pocos estudios del GDF15 urinario. Se había objetivado que el GDF15 urinario estaba elevado en pacientes diabéticos de tipo 2 con disminución de FG, independientemente de la albuminuria y de otros factores (73). Sin embargo, ningún estudio previo había abordado la relación entre GDF15 urinario e histología renal o entre GDF15 urinario y pronóstico.

Los niveles de GDF15 urinario fueron más altos (casi 3 veces más altos) entre los pacientes que fallecieron que en los pacientes vivos (sin o con diálisis) al final del estudio; y fueron casi el doble en los pacientes muertos o con diálisis al final de estudio que en los pacientes vivos sin diálisis. En estudios de árbol de clasificación, un punto de corte de GDF15 urinario de 19,96 ng/mg clasificó dos grupos de pacientes: entre los pacientes de GDF15 urinario <19,96 ng/mg la mortalidad fue un 6% y entre los pacientes con GDF15 urinario mayor de este valor, la mortalidad fue un 83%. En análisis multivariantes por modelos de regresión logística, el GDF15 en orina predijo mortalidad en un modelo en el que la edad, el sexo, el FG basal, y la albuminuria no resultaron significativos. En otro modelo, que incluyó como variables estudiadas incluyó orina sangre y edad, el GDF15 en orina y la edad fueron factores predictores independientes de supervivencia. En un análisis de sensibilidad, GDF15 en orina junto con FG basal fueron predictores independientes de muerte o diálisis, en un modelo en el que la edad, el sexo y la albuminuria no fueron significativos. Finalmente, el análisis de curvas ROC mostró que el GDF15 en orina con un punto de corte de 13,83 ng/mg, tuvo un área bajo la curva muy alto (0,95), para predecir mortalidad, lo que corresponde a una sensibilidad del 100% y una especificidad del 81%. A destacar que lo que estamos analizando son niveles de GDF15 urinarios basales, es decir antes de las modificaciones del tratamiento resultantes del diagnóstico histológico de la biopsia renal. De alguna manera, independientemente del resultado de la biopsia y de las maniobras terapéuticas resultantes, un GDF15 urinario alto es un factor de muy mal pronóstico vital. Tenemos estudios en marcha para analizar si este valor predictivo de mortalidad se observa en otras poblaciones (cohorte de pacientes con nefropatía diabética) o nefropatías agudas (cohorte de pacientes ingresados en unidad de cuidados intensivos).

No había estudios previos sobre la relación entre GDF15 urinario y pronóstico. Sin embargo, ya se había comunicado la asociación entre GDF15 sérico y mortalidad en pacientes con diversas enfermedades, incluyendo la ERC. En pacientes en hemodiálisis y en diabéticos también los niveles altos de GDF15 resultaron predictivos de

mortalidad (71, 72). Nuestros datos confirman pues que los niveles séricos de GDF15 tienen valor predictivo para mortalidad.

Llamativamente en un análisis multivariable, la inclusión del GDF15 urinario como factor predictor de riesgo de muerte excluyó a GDF15 sérico como predictor de mortalidad. Por lo tanto, a pesar de que estaba descrita la asociación entre GDF15 sérico y mortalidad, la asociación parece más fuerte entre GDF15 urinario y mortalidad. En este sentido, objetivamos una correlación entre GDF15 sérico y urinario.

En 2017, se observó que en pacientes con ERC los niveles de GDF15 séricos predecían la progresión de la ERC (68). En pacientes diabéticos, los niveles séricos más altos de GDF15 también se asociaron a una pérdida más rápida de la tasa de filtración glomerular (72). Nosotros no objetivamos una relación con entre GDF15 y la pérdida progresiva de FG. Esta diferencia con los datos publicados en la literatura podría deberse al menor tamaño muestral, a diferencias en el tiempo de seguimiento o a otros factores dependientes de la población estudiada.

5. ¿De dónde proviene el GDF5 urinario?

En base a los resultados observados, el aumento de GDF15 sérico al bajar el FG podía deberse a una menor filtración glomerular de GDF15, ya que es una pequeña proteína de 25Da. Alternativamente, el daño renal podría aumentar la síntesis, al igual que aumenta la síntesis de otras citoquinas y mediadores en el contexto del estado inflamatorio de la uremia.

Datos recientes que objetivan una relación entre GDF15 sérico y expresión de ARN de GDF15 renal (68) podrían interpretarse como que parte de esta putativa excesiva síntesis de GDF15 ocurre en el riñón. Sin embargo, no existía información sobre el posible origen del GDF15 urinario, y los estudios de correlación entre niveles de GDF15 urinario y variables bioquímicas en nuestro estudio no resultaron informativas. Sin ser

definitivos, los datos de inmunohistoquímica renal, que objetivan una cierta asociación entre niveles de GDF15 urinarios y nivel de tinción para GDF15 renal, una expresión tubular del GDF15 renal, y la presencia de tinción para GDF15 en la luz tubular, sugieren que el GDF15 urinario podría originarse en el riñón.

En ese sentido, el pequeño tamaño de GDF15 es consistente con una libre filtración glomerular, aunque en este caso sería esperable que fuera reabsorbida por el túbulo proximal. Así, las posibles causas de aumento de GDF15 urinario pueden ser:

- Incremento de la producción local de GDF15 en riñón dañado. Esta es nuestra hipótesis actual, dada la detección de grandes cantidades de proteína GDF15 en células tubulares e intersticiales renales en las biopsias renales humanas, así como la coexistencia de GDF15 en el epitelio tubular y en la luz de los túbulos.
- Disfunción tubular proximal que impidiera la reabsorción de esta pequeña proteína. En contra de esta posibilidad, en general no se objetivaron características bioquímicas de tubulopatía proximal
- Aumento de la filtración glomerular secundario a un aumento masivo de la producción sistémica, como ocurre en proteinuria de Bence Jones, que sobrepasaría la capacidad de reabsorción tubular.
- Es altamente improbable que un aumento de la permeabilidad glomerular a proteínas resulte en mayor filtración glomerular de GDF15. Por su tamaño, debería filtrarse ya libremente por el glomérulo normal. Adicionalmente, no existió relación entre eliminación urinaria de GDF15 y albuminuria.

6. ¿Por qué un GDF15 urinario alto se asocia a mortalidad?

La primera opción podría ser que el GDF15 tuviera efectos adversos que de alguna forma limitaran la supervivencia. No obstante, si existiera esta relación causal, sería más esperable una buena relación entre GDF15 sérico y mortalidad que entre GDF15 urinario y mortalidad. Sin embargo, la inclusión de GDF15 urinario en el análisis multivariable para predecir mortalidad hace que la relación entre GDF15 sérico y

mortalidad no sea significativa. Es posible que esto se deba a la buena correlación entre GDF15 sérico y GDF15 urinario. Esta buena correlación apoyaría la hipótesis de Nair y colaboradores de que el aumento de GDF15 sérico en la ERC tendría un origen renal (68), al igual que podría tenerlo el GDF15 urinario. No obstante, los escasos estudios funcionales disponibles en la actualidad, sugieren que GDF15 renal tiene un papel nefroprotector (66). Por eso, planteamos la hipótesis de que GDF15 no sea directamente lesivo, pero que podría representar una respuesta adaptativa ante una lesión renal más grave y que esta misma lesión renal más grave sea la responsable de poner en marcha los mecanismos que limitan la supervivencia. Por ejemplo, la lesión renal se asocia a menor producción renal de Klotho, que codifica una proteína con propiedades antienviejecimiento. De esta manera, hipotetizamos que GDF15 se comportaría de forma similar a los receptores solubles para TNF (sTNFR1 y sTNFR2): los niveles más altos de estos receptores solubles se asocian a mayor mortalidad, aunque se piensa que suponen una forma de limitar los efectos adversos del TNF (94-97). Por lo tanto, los receptores solubles de TNF serían marcadores de una mayor actividad inflamatoria y representarían un aumento compensador, comportándose como marcadores, pero sin contribuir directamente a la mortalidad. Es más, se podría hipotetizar que la compensación es insuficiente, de ahí la asociación con mortalidad, y que quizá niveles todavía más elevados podrían ser incluso protectores. Con la información actualmente disponible sobre GDF15, esta es nuestra interpretación actual de los resultados para esta molécula.

7. Diferencias entre hombres y mujeres

Si bien no existieron claras diferencias entre hombres y mujeres en los niveles séricos o urinarios de GDF15, cuando analizamos la relación entre niveles de GDF15 séricos o urinarios con distintas variables bioquímicas basales, se objetivó un mayor número de variables significativamente asociadas a GDF15 sérico o urinario en hombres que en mujeres. Así GDF15 urinario se correlacionó con la albúmina sérica, el colesterol, la glucemia y la leucocituria en hombres, pero no en mujeres. El GDF15 sérico se correlacionó con la albúmina, el fosfato sérico, el colesterol, la hemoglobina, la

leucocituria, la hematuria y la albuminuria en hombres, pero no en mujeres. Es posible que esto se deba a mayor número de hombres. No obstante, la magnitud de la asociación también fue mayor para los varones, por lo que no podemos descartar y merecería la pena estudiar en series más amplias si existe un comportamiento diferente de los valores de GDF15 séricos y urinarios y su valor pronóstico en hombres y en mujeres.

8. Fortalezas

Entre las fortalezas del estudio destacamos el diseño, que partiendo de un análisis no sesgado de bases de datos de biología de sistemas, identifica a un gen diferencialmente expresado, caracteriza su expresión renal en diversas nefropatías preclínicas y clínicas, mide los niveles séricos y urinarios en una cohorte seguida prospectivamente y biopsiada, y permite establecer, tentativamente, el potencial valor de GDF15 urinario como marcador de riesgo de muerte y de la nefropatía subyacente en los pacientes diabéticos.

Al ser un estudio un céntrico el protocolo de recogida y procesamiento de muestras, estudio de los pacientes y seguimiento es más uniforme que en estudios multicéntricos.

Los datos de expresión de RNA fueron confirmados en diversas nefropatías de dos especies y está basado en la experiencia propia y el análisis de bases de datos que contienen información de publicaciones de múltiples grupos diferentes, lo que da más solidez a los hallazgos.

9. Debilidades

Este estudio presenta algunas debilidades.

Hemos partido de bases de datos transcriptómicas. En general los cambios de expresión de ARNm se traducen en cambios de expresión de la proteína, pero no siempre es así. No obstante, en los estudios humanos hemos cuantificado GDF15 en suero y en orina, observando que esta aumentado en diversas nefropatías, y hemos realizado inmunohistoquímica que ha localizado la expresión a las células tubulares.

Las bases de datos, sobretodo en humanos, son heterogéneas en cuando a porción del riñón estudiada, controles usados y técnicas empleadas para procesar ARN y hacer transcriptómica. No obstante, como indicamos en el apartado anterior, en nuestra cohorte de pacientes biopsiados hemos medido la proteína GDF15 y hemos caracterizado fuentes de variabilidad de sus niveles, fundamentalmente el FG.

El tamaño muestral analizado para estudiar la relación entre niveles de GDF15 y pronóstico es relativamente pequeño. Además, el número de eventos no fue elevado. En este sentido sería deseable confirmar estos resultados en una cohorte más amplia. Estos estudios están ya planificados o en marcha. El hecho de que, a pesar del tamaño muestral pequeño, se observe una clara asociación entre GDF15 en suero y sobretodo urinario con el riesgo de muerte, sugiere que la magnitud de la relación es grande.

Finalmente, las muestras estudiadas mediante inmunohistoquímica de GDF15 son también escasas. No obstante, se pueden sacar conclusiones en firme como la localización fundamentalmente tubular y en células infiltrantes intersticiales de GDF15. Para establecer relaciones entre GDF15 urinario o plasmático y GDF15 renal sería aconsejable estudiar una cohorte más grande.

Al ser un estudio unicéntrico, existe la posibilidad de que los resultados no sean aplicables a otros centros con mezclas de casos o protocolos asistenciales diferentes.

Así mismo la composición étnica, fundamentalmente caucásicos, hace que los resultados pudieran no ser extrapolables a otras etnias como los afroamericanos o los asiáticos.

El número de controles con medida de GDF15 sérico y urinario es relativamente pequeño, aunque los resultados fueron claramente homogéneos y bastantes diferentes de pacientes con nefropatías.

10. Resumen

En resumen, objetivamos un aumento de la expresión renal de GDF15 en numerosa glomerulopatías intersticiales y glomerulares experimentales y humanas, esto sugiere que GDF15 puede ser una respuesta relativamente inespecífica al estrés de las células renales. El estrés celular suele generar una respuesta inflamatoria. Por lo que evaluamos el efecto de la administración sistémica de una citoquina inflamatoria sobre la expresión renal de GDF15. Sin embargo, la administración sistémica de Tweak bajo los niveles de GDF15 con lo cual la inflamación podría no ser responsable del aumento de expresión local de GDF15 del daño renal. Sin poder descartar que sean otros mediadores de la inflamación los responsables del aumento del GDF15, hipotetizamos que otros factores, quizá factores nefroprotectores podrían ser los responsables.

Los niveles urinarios y séricos de GDF15 estaban aumentados en pacientes con ERC biopsiada. Los aspectos más prometedores del estudio fueron las asociaciones entre niveles de GDF15 urinario con mortalidad y con el diagnóstico de nefropatía diabética en pacientes con diabetes. Ambos hallazgos requieren validación en una segunda cohorte. Ya hemos comenzado estos estudios de validación.

Conclusiones

1. La expresión renal de GDF15 está aumentada en nefropatías experimentales y clínicas.
2. En la enfermedad renal crónica el GDF15 en suero aumenta al disminuir el filtrado glomerular.
3. En la enfermedad renal crónica está aumentado el GDF15 en orina.
4. Los valores de GDF15 urinario podrían contribuir a diferenciar la causa del daño renal en pacientes diabéticos.
5. Los niveles séricos y urinarios de GDF15 identifican pacientes con un alto riesgo de muerte.

Referencias Bibliográficas

1. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney International*. 2013;3(1).
2. IHME. Global Burden of Disease (GBD) Seattle, USA [Octubre 2016]. Available from: <http://www.healthdata.org/gbd>.
3. Otero A, de Francisco A, Gayoso P, García F, Group ES. Prevalence of chronic renal disease in Spain: results of the EPIRCE study. *Nefrología*. 2010;30(1):78-86.
4. Floege J, Amann K. Primary glomerulonephritides. *Lancet*. 2016;387(10032):2036-48.
5. Jha V, Garcia-Garcia G, Iseki K, Li Z, Naicker S, Plattner B, et al. Chronic kidney disease: global dimension and perspectives. *Lancet*. 2013;382(9888):260-72.
6. Martín Escobar E, (REER) REdER. The Spanish Renal Registry: 2013 report and evolution from 2007-2013. *Nefrología*. 2016;36(2):97-120.
7. Fernández Fresnedo G. Glomerulonefritis Primarias. Enero 2017. In: *Nefrología al Día* [Fecha consulta: Enero 2017] [Internet]. Available from: <http://www.revistanefrologia.com/es-monografias-nefrologia-dia-articulo-glomerulonefritis-primarias-10>.
8. Cobo Caso M, Miquel Rodríguez R, González Rinne A, DelgadoMallén P. Afectación renal en las enfermedades sistémicas. In: *Nefrología al Día* [Fecha consulta: Enero 2017] [Internet]. Available from: <http://dev.nefro.elsevier.es/es-monografias-nefrologia-dia-articulo-enfermedades-sistmicas-rin-16>.
9. KDIGO Clinical Practice Guideline for Glomerulonephritis. *Kidney International*. 2012;2(2).
10. Rivera F, López-Gómez JM, Pérez-García R, Glomerulonephritis SRO. Frequency of renal pathology in Spain 1994-1999. *Nephrol Dial Transplant*. 2002;17(9):1594-602.
11. Ortiz A, Egido J. Etiopatogenia de Enfermedades Glomerulares. 4 ed: Panamericana; 2014. 301-12 p.
12. Chadban SJ, Atkins RC. Glomerulonephritis. *Lancet*. 2005;365(9473):1797-806.
13. Ronco P. Mechanisms of immune injury of the glomerulus. In: UpToDate, Waltham, MA [Accessed on January 17, 2017] [Internet].
14. Hoxha E, Kneißler U, Stege G, Zahner G, Thiele I, Panzer U, et al. Enhanced expression of the M-type phospholipase A2 receptor in glomeruli correlates with serum receptor antibodies in primary membranous nephropathy. *Kidney Int*. 2012;82(7):797-804.
15. Sun Q, Zhang Z, Zhang H, Liu X. Aberrant IgA1 Glycosylation in IgA Nephropathy: A Systematic Review. *PLoS One*. 2016;11(11):e0166700.
16. Ma H, Sandor DG, Beck LH. The role of complement in membranous nephropathy. *Semin Nephrol*. 2013;33(6):531-42.
17. Ji M, Lu Y, Zhao C, Gao W, He F, Zhang J, et al. C5a Induces the Synthesis of IL-6 and TNF- α in Rat Glomerular Mesangial Cells through MAPK Signaling Pathways. *PLoS One*. 2016;11(9):e0161867.
18. Fakhouri F, Frémeaux-Bacchi V, Noël LH, Cook HT, Pickering MC. C3 glomerulopathy: a new classification. *Nat Rev Nephrol*. 2010;6(8):494-9.
19. Schreiber A, Xiao H, Jennette JC, Schneider W, Luft FC, Kettritz R. C5a receptor mediates neutrophil activation and ANCA-induced glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20(2):289-98.

20. Chen M, Jayne DR, Zhao MH. Complement in ANCA-associated vasculitis: mechanisms and implications for management. *Nat Rev Nephrol*. 2017.
21. Hoyer JR, Vernier RL, Najarian JS, Raij L, Simmons RL, Michael AF. Recurrence of idiopathic nephrotic syndrome after renal transplantation. *Lancet*. 1972;2(7773):343-8.
22. Liu G, Kaw B, Kurfis J, Rahmanuddin S, Kanwar YS, Chugh SS. Neph1 and nephrin interaction in the slit diaphragm is an important determinant of glomerular permeability. *J Clin Invest*. 2003;112(2):209-21.
23. Lovric S, Ashraf S, Tan W, Hildebrandt F. Genetic testing in steroid-resistant nephrotic syndrome: when and how? *Nephrol Dial Transplant*. 2016;31(11):1802-13.
24. Han Y, Ma FY, Tesch GH, Manthey CL, Nikolic-Paterson DJ. Role of macrophages in the fibrotic phase of rat crescentic glomerulonephritis. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2013;304(8):F1043-53.
25. Yang Y, Zhang SY, Sich M, Béziau A, van den Heuvel LP, Gubler MC. Glomerular extracellular matrix and growth factors in diffuse mesangial sclerosis. *Pediatr Nephrol*. 2001;16(5):429-38.
26. Group. BDW. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther*. 2001;69(3):89-95.
27. Castillo-Rodriguez E, Fernandez-Prado R, Martin-Cleary C, Pizarro-Sánchez MS, Sanchez-Niño MD, Sanz AB, et al. Kidney Injury Marker 1 and Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin in Chronic Kidney Disease. *Nephron*. 2016.
28. Argilés Á, Siwy J, Duranton F, Gayraud N, Dakna M, Lundin U, et al. CKD273, a new proteomics classifier assessing CKD and its prognosis. *PLoS One*. 2013;8(5):e62837.
29. Devarajan P. Proteomics for biomarker discovery in acute kidney injury. *Semin Nephrol*. 2007;27(6):637-51.
30. Wakefield LM, Hill CS. Beyond TGFβ: roles of other TGFβ superfamily members in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2013;13(5):328-41.
31. Chen W, Ten Dijke P. Immunoregulation by members of the TGFβ superfamily. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(12):723-40.
32. Schnaper HW, Jandeska S, Runyan CE, Hubchak SC, Basu RK, Curley JF, et al. TGF-beta signal transduction in chronic kidney disease. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2009;14:2448-65.
33. Bran GM, Sommer UJ, Goessler UR, Hörmann K, Riedel F, Sadick H. TGF-β1 antisense impacts the SMAD signalling system in fibroblasts from keloid scars. *Anticancer Res*. 2010;30(9):3459-63.
34. Hinck AP, Mueller TD, Springer TA. Structural Biology and Evolution of the TGF-β Family. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2016;8(12).
35. Fujio K, Komai T, Inoue M, Morita K, Okamura T, Yamamoto K. Revisiting the regulatory roles of the TGF-β family of cytokines. *Autoimmun Rev*. 2016;15(9):917-22.
36. Hinck AP. Structural studies of the TGF-βs and their receptors - insights into evolution of the TGF-β superfamily. *FEBS Lett*. 2012;586(14):1860-70.
37. Huang H, You Y, Lin X, Tang C, Gu X, Huang M, et al. Inhibition of TRPC6 Signal Pathway Alleviates Podocyte Injury Induced by TGF-β1. *Cell Physiol Biochem*. 2017;41(1):163-72.

38. Langsford D, Tang M, Cheikh Hassan HI, Djurdjev O, Sood MM, Levin A. The Association between Biomarker Profiles, Etiology of Chronic Kidney Disease, and Mortality. *Am J Nephrol*. 2017;45(3):226-34.
39. Goumenos DS, Tsakas S, El Nahas AM, Alexandri S, Oldroyd S, Kalliakmani P, et al. Transforming growth factor-beta(1) in the kidney and urine of patients with glomerular disease and proteinuria. *Nephrol Dial Transplant*. 2002;17(12):2145-52.
40. Woroniecki RP, Shatat IF, Supe K, Du Z, Kaskel FJ. Urinary cytokines and steroid responsiveness in idiopathic nephrotic syndrome of childhood. *Am J Nephrol*. 2008;28(1):83-90.
41. Trachtman H, Fervenza FC, Gipson DS, Heering P, Jayne DR, Peters H, et al. A phase 1, single-dose study of fresolimumab, an anti-TGF- β antibody, in treatment-resistant primary focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int*. 2011;79(11):1236-43.
42. A Study of Fresolimumab in Patients With Steroid-Resistant Primary Focal Segmental Glomerulosclerosis (FSGS), ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01665391. [Fecha de consulta: Enero 2017]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01665391?term=NCT01665391&rank=1>.
43. Unsicker K, Spittau B, Krieglstein K. The multiple facets of the TGF- β family cytokine growth/differentiation factor-15/macrophage inhibitory cytokine-1. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2013;24(4):373-84.
44. Berezin AE. Diabetes mellitus related biomarker: The predictive role of growth-differentiation factor-15. *Diabetes Metab Syndr*. 2016;10(1 Suppl 1):S154-7.
45. Wu Q, Jiang D, Matsuda JL, Ternyak K, Zhang B, Chu HW. Cigarette Smoke Induces Human Airway Epithelial Senescence via Growth Differentiation Factor 15 Production. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2016;55(3):429-38.
46. Mimeault M, Batra SK. Divergent molecular mechanisms underlying the pleiotropic functions of macrophage inhibitory cytokine-1 in cancer. *J Cell Physiol*. 2010;224(3):626-35.
47. Maetzler W, Deleersnijder W, Hanssens V, Bernard A, Brockmann K, Marquetand J, et al. GDF15/MIC1 and MMP9 Cerebrospinal Fluid Levels in Parkinson's Disease and Lewy Body Dementia. *PLoS One*. 2016;11(3):e0149349.
48. Wiklund FE, Bennet AM, Magnusson PK, Eriksson UK, Lindmark F, Wu L, et al. Macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1/GDF15): a new marker of all-cause mortality. *Aging Cell*. 2010;9(6):1057-64.
49. Windrichova J, Fuchsova R, Kucera R, Topolcan O, Fiala O, Finek J, et al. MIC1/GDF15 as a Bone Metastatic Disease Biomarker. *Anticancer Res*. 2017;37(3):1501-5.
50. Li C, Wang X, Casal I, Wang J, Li P, Zhang W, et al. Growth differentiation factor 15 is a promising diagnostic and prognostic biomarker in colorectal cancer. *J Cell Mol Med*. 2016;20(8):1420-6.
51. Wang X, Yang Z, Tian H, Li Y, Li M, Zhao W, et al. Circulating MIC-1/GDF15 is a complementary screening biomarker with CEA and correlates with liver metastasis and poor survival in colorectal cancer. *Oncotarget*. 2017.
52. Zhang Y, Hua W, Niu LC, Li SM, Wang YM, Shang L, et al. Elevated growth differentiation factor 15 expression predicts poor prognosis in epithelial ovarian cancer patients. *Tumour Biol*. 2016;37(7):9423-31.

53. Westhlin M, Moen SH, Holien T, Mylin AK, Heickendorff L, Olsen OE, et al. Growth differentiation factor 15 (GDF15) promotes osteoclast differentiation and inhibits osteoblast differentiation and high serum GDF15 levels are associated with multiple myeloma bone disease. *Haematologica*. 2015;100(12):e511-4.
54. Mengual L, Lozano JJ, Ingelmo-Torres M, Izquierdo L, Musquera M, Ribal MJ, et al. Using gene expression from urine sediment to diagnose prostate cancer: development of a new multiplex mRNA urine test and validation of current biomarkers. *BMC Cancer*. 2016;16:76.
55. Collinson P. The role of cardiac biomarkers in cardiovascular disease risk assessment. *Curr Opin Cardiol*. 2014;29(4):366-71.
56. Wang X, Chen LL, Zhang Q. Increased Serum Level of Growth Differentiation Factor 15 (GDF-15) is Associated with Coronary Artery Disease. *Cardiovasc Ther*. 2016;34(3):138-43.
57. Wang X, Zhu L, Wu Y, Sun K, Su M, Yu L, et al. Plasma growth differentiation factor 15 predicts first-ever stroke in hypertensive patients. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95(30):e4342.
58. Zhang S, Dai D, Wang X, Zhu H, Jin H, Zhao R, et al. Growth differentiation factor-15 predicts the prognoses of patients with acute coronary syndrome: a meta-analysis. *BMC Cardiovasc Disord*. 2016;16:82.
59. Farhan S, Freynhofer MK, Brozovic I, Bruno V, Vogel B, Tentzeris I, et al. Determinants of growth differentiation factor 15 in patients with stable and acute coronary artery disease. A prospective observational study. *Cardiovasc Diabetol*. 2016;15:60.
60. Gerstein HC, Pare G, Hess S, Ford RJ, Sjaarda J, Raman K, et al. Growth Differentiation Factor 15 as a Novel Biomarker for Metformin. *Diabetes Care*. 2017;40(2):280-3.
61. Schernthaner-Reiter MH, Kasses D, Tugendsam C, Riedl M, Peric S, Prager G, et al. Growth differentiation factor 15 increases following oral glucose ingestion: effect of meal composition and obesity. *Eur J Endocrinol*. 2016;175(6):623-31.
62. Krawczyk M, Zimmermann S, Hess G, Holz R, Dauer M, Raedle J, et al. Panel of three novel serum markers predicts liver stiffness and fibrosis stages in patients with chronic liver disease. *PLoS One*. 2017;12(3):e0173506.
63. Husebø GR, Grønseth R, Lerner L, Gyuris J, Hardie JA, Bakke PS, et al. Growth differentiation factor-15 is a predictor of important disease outcomes in patients with COPD. *Eur Respir J*. 2017;49(3).
64. Chai YL, Hilal S, Chong JP, Ng YX, Liew OW, Xu X, et al. Growth differentiation factor-15 and white matter hyperintensities in cognitive impairment and dementia. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95(33):e4566.
65. Chen Q, Wang Y, Zhao M, Hyett J, da Silva Costa F, Nie G. Serum levels of GDF15 are reduced in preeclampsia and the reduction is more profound in late-onset than early-onset cases. *Cytokine*. 2016;83:226-30.
66. Mazagova M, Buikema H, van Buiten A, Duin M, Goris M, Sandovici M, et al. Genetic deletion of growth differentiation factor 15 augments renal damage in both type 1 and type 2 models of diabetes. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2013;305(9):F1249-64.

67. Zimmers TA, Jin X, Hsiao EC, McGrath SA, Esquela AF, Koniaris LG. Growth differentiation factor-15/macrophage inhibitory cytokine-1 induction after kidney and lung injury. *Shock*. 2005;23(6):543-8.
68. Nair V, Robinson-Cohen C, Smith MR, Bellovich KA, Bhat ZY, Bobadilla M, et al. Growth Differentiation Factor-15 and Risk of CKD Progression. *J Am Soc Nephrol*. 2017.
69. Kahli A, Guenancia C, Zeller M, Grosjean S, Stamboul K, Rochette L, et al. Growth differentiation factor-15 (GDF-15) levels are associated with cardiac and renal injury in patients undergoing coronary artery bypass grafting with cardiopulmonary bypass. *PLoS One*. 2014;9(8):e105759.
70. Guenancia C, Kahli A, Laurent G, Hachet O, Malapert G, Grosjean S, et al. Pre-operative growth differentiation factor 15 as a novel biomarker of acute kidney injury after cardiac bypass surgery. *Int J Cardiol*. 2015;197:66-71.
71. Breit SN, Carrero JJ, Tsai VW, Yagoutifam N, Luo W, Kuffner T, et al. Macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1/GDF15) and mortality in end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2012;27(1):70-5.
72. Lajer M, Jorsal A, Tarnow L, Parving HH, Rossing P. Plasma growth differentiation factor-15 independently predicts all-cause and cardiovascular mortality as well as deterioration of kidney function in type 1 diabetic patients with nephropathy. *Diabetes Care*. 2010;33(7):1567-72.
73. Simonson MS, Tiktin M, Debanne SM, Rahman M, Berger B, Hricik D, et al. The renal transcriptome of db/db mice identifies putative urinary biomarker proteins in patients with type 2 diabetes: a pilot study. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2012;302(7):F820-9.
74. Nephroseq [Accessed on February, 2017] University of Michigan O'Brien Renal Center [Available from: <https://www.nephroseq.org/resource/login.html>].
75. Ortiz A, Husi H, Gonzalez-Lafuente L, Valiño-Rivas L, Fresno M, Sanz AB, et al. Mitogen-Activated Protein Kinase 14 Promotes AKI. *J Am Soc Nephrol*. 2017;28(3):823-36.
76. Sanchez-Niño MD, Poveda J, Sanz AB, Mezzano S, Carrasco S, Fernandez-Fernandez B, et al. Fn14 in podocytes and proteinuric kidney disease. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1832(12):2232-43.
77. Sanz AB, Justo P, Sanchez-Niño MD, Blanco-Colio LM, Winkles JA, Kreztler M, et al. The cytokine TWEAK modulates renal tubulointerstitial inflammation. *J Am Soc Nephrol*. 2008;19(4):695-703.
78. Wu J, Zhou T, He J, Mountz JD. Autoimmune disease in mice due to integration of an endogenous retrovirus in an apoptosis gene. *J Exp Med*. 1993;178(2):461-8.
79. Izquierdo MC, Sanz AB, Mezzano S, Blanco J, Carrasco S, Sanchez-Niño MD, et al. TWEAK (tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis) activates CXCL16 expression during renal tubulointerstitial inflammation. *Kidney Int*. 2012;81(11):1098-107.
80. Graña O, Rubio-Camarillo M, Fdez-Riverola F, Pisano DG, Glez-Peña D. Nextpresso: next generation sequencing expression analysis pipeline 2017. Available from: <http://bioinfo.cnio.es/nextpresso/>.
81. Earley A, Miskulin D, Lamb EJ, Levey AS, Uhlig K. Estimating equations for glomerular filtration rate in the era of creatinine standardization: a systematic review.

Ann Intern Med. 2012;156(11):785-95, W-270, W-1, W-2, W-3, W-4, W-5, W-6, W-7, W-8.

82. IBM-SPSS. SPSS Statistics 22.0 Command Syntax Reference 2013.

83. Ferrán Aranaz M. SPSS para Windows : Programación y análisis estadístico. Madrid etc.: McGraw-Hill; 1996. XLIII, 580 p. p.

84. Everitt BS. The analysis of contingency tables. 2nd. ed. London etc: Chapman & Hall; 1992. VII, 164 p. p.

85. Berthier CC, Bethunaickan R, Gonzalez-Rivera T, Nair V, Ramanujam M, Zhang W, et al. Cross-species transcriptional network analysis defines shared inflammatory responses in murine and human lupus nephritis. J Immunol. 2012;189(2):988-1001.

86. Hodgin JB, Nair V, Zhang H, Randolph A, Harris RC, Nelson RG, et al. Identification of cross-species shared transcriptional networks of diabetic nephropathy in human and mouse glomeruli. Diabetes. 2013;62(1):299-308.

87. Higgins JP, Wang L, Kambham N, Montgomery K, Mason V, Vogelmann SU, et al. Gene expression in the normal adult human kidney assessed by complementary DNA microarray. Mol Biol Cell. 2004;15(2):649-56.

88. Nakagawa S, Nishihara K, Miyata H, Shinke H, Tomita E, Kajiwarra M, et al. Molecular Markers of Tubulointerstitial Fibrosis and Tubular Cell Damage in Patients with Chronic Kidney Disease. PLoS One. 2015;10(8):e0136994.

89. Ju W, Greene CS, Eichinger F, Nair V, Hodgin JB, Bitzer M, et al. Defining cell-type specificity at the transcriptional level in human disease. Genome Res. 2013;23(11):1862-73.

90. Sampson MG, Robertson CC, Martini S, Mariani LH, Lemley KV, Gillies CE, et al. Integrative Genomics Identifies Novel Associations with APOL1 Risk Genotypes in Black NEPTUNE Subjects. J Am Soc Nephrol. 2016;27(3):814-23.

91. Hodgin JB, Borczuk AC, Nasr SH, Markowitz GS, Nair V, Martini S, et al. A molecular profile of focal segmental glomerulosclerosis from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. Am J Pathol. 2010;177(4):1674-86.

92. Reich HN, Tritchler D, Cattran DC, Herzenberg AM, Eichinger F, Boucherot A, et al. A molecular signature of proteinuria in glomerulonephritis. PLoS One. 2010;5(10):e13451.

93. Ruiz-Andres O, Sanchez-Niño MD, Moreno JA, Ruiz-Ortega M, Ramos AM, Sanz AB, et al. Downregulation of kidney protective factors by inflammation: role of transcription factors and epigenetic mechanisms. Am J Physiol Renal Physiol. 2016;311(6):F1329-F40.

94. Carlsson AC, Östgren CJ, Nystrom FH, Länne T, Jennersjö P, Larsson A, et al. Association of soluble tumor necrosis factor receptors 1 and 2 with nephropathy, cardiovascular events, and total mortality in type 2 diabetes. Cardiovasc Diabetol. 2016;15:40.

95. Carlsson AC, Juhlin CC, Larsson TE, Larsson A, Ingelsson E, Sundström J, et al. Soluble tumor necrosis factor receptor 1 (sTNFR1) is associated with increased total mortality due to cancer and cardiovascular causes - findings from two community based cohorts of elderly. Atherosclerosis. 2014;237(1):236-42.

96. Luna JM, Moon Y, Liu K, Spitalnik S, Paik M, Sacco R, et al. Tumour necrosis factor receptor 1 and mortality in a multi-ethnic cohort: the Northern Manhattan Study. Age Ageing. 2013;42(3):385-90.

97. Castillo-Rodríguez E, Pizarro-Sánchez S, Sanz AB, Ramos AM, Sanchez-Niño MD, Martin-Cleary C, et al. Inflammatory Cytokines as Uremic Toxins: "Ni Son Todos Los Que Estan, Ni Estan Todos Los Que Son". *Toxins (Basel)*. 2017;9(4).